

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA  
IN VALORIZZAZIONE E GESTIONE DELLE RISORSE  
AGRO-FORESTALI**

**-BONIFICA DEL SUOLO-**

**CARATTERIZZAZIONE DI FRAZIONI A DIFFERENTI  
DIMENSIONI MOLECOLARI SEPARATE DA UN ACIDO  
UMICO DA SUOLO E DI FRAZIONI DI COMPOST A  
DIVERSA POLARITÀ**

**DOCENTE GUIDA  
CH.MO PROF.  
ALESSANDRO PICCOLO**

**CANDIDATO  
DR. SALVATORE BAIANO**

**IL COORDINATORE  
CH.MO PROF.  
ANTONIO CIOFFI**

**Anni accademici 2003-2006**

## **CAPITOLO 1**

<b>LA SOSTANZA ORGANICA DEL SUOLO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Introduzione.....	1
1.2 La sostanza organica naturale (NOM).....	2
1.3 Frazione umica: caratteristiche chimiche. ....	4
1.4 La struttura delle sostanze umiche .....	5
1.5 Origine delle sostanze umiche.....	10
1.6 Ruolo delle sostanze umiche nella fertilità dei suoli. ....	14

## **CAPITOLO 2**

<b>OBIETTIVO DELLA TESI E DISEGNO SPERIMENTALE. ....</b>	<b>21</b>
--	-----------

## **CAPITOLO 3**

<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>25</b>
3.1 Estrazione e purificazione dell'acido umico .....	25
3.2 Separazione di frazioni umiche mediante cromatografia ad esclusione molecolare in alta pressione .....	26
3.3 Compost e sue frazioni a diversa polarità.....	27
3.4 Analisi elementare .....	28
3.5 Procedura di frazionamento analitico .....	29
3.5.1 Estrazione dei composti non legati strutturalmente alla matrice umica.....	29
3.5.2 Frazionamento dei composti debolmente legati alla matrice umica.....	29
3.5.3 Frazionamento dei composti fortemente legati alla matrice umica.....	30
3.5.4 Frazionamento con SPE .....	31
3.6 Analisi gas cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS) .....	32
3.6.1 Derivatizzazione .....	32
3.6.2 Gas cromatografia-spettrometria di massa (GC/MS) .....	33
3.6.3 Pirolisi e termochemolisi "in-linea" alla GC/MS .....	33
3.7 CPMAS <sup>13</sup> C NMR.....	34
3.8 Spettrometria di massa con interfaccia ad elettrospray (ESI-MS) .....	34

## **CAPITOLO 4**

<b>CARATTERISTICHE GENERALI DEI CAMPIONI UMICI.....</b>	<b>35</b>
4.1 Cromatografia ad esclusione molecolare ad alta pressione .....	35
4.2 Analisi elementare .....	37
4.3 CPMAS <sup>13</sup> C NMR.....	37
4.4 Frazionamento chimico sequenziale.....	40

## **CAPITOLO 5**

<b>ANALISI GC/MS DEI PRODOTTI ORGANO-SOLUBILI OTTENUTI DAL FRAZIONAMENTO SEQUENZIALE DEI CAMPIONI UMICI.....</b>	<b>43</b>
5.1 Introduzione.....	43
5.2. Componente libera.....	46
5.2.1 <i>Acidi alifatici</i> .....	48
5.2.2 <i>Alcanoli</i> .....	54
5.2.3 <i>Carboidrati</i> .....	57
5.2.4 <i>Alcani</i> .....	63
5.2.5 <i>Steroidi e terpenoidi</i> .....	65
5.3 Componente rilasciata dopo transesterificazione e dopo metanolisi.....	66
5.3.1 <i>Composti aromatici</i> .....	72
5.3.2 <i>Carboidrati</i> .....	73
5.3.3 <i>Acidi idrossilati</i> .....	74
5.4 Conclusioni	

## **CAPITOLO 6**

<b>TERMOCHEMOLISI-GC/MS DEI CAMPIONI UMICI .....</b>	<b>84</b>
6.1 Introduzione.....	84
6.2 Pirolisi “in-linea” alla GC-MS delle sostanze umiche in presenza di TMAH .....	84
6.2.1 <i>Composti aromatici</i> .....	85
6.2.2 <i>Composti alchilici</i> .....	89
6.2.3 <i>Carboidrati</i> .....	92
6.2.4 <i>Composti contenenti azoto e zolfo</i> .....	93
6.3 Termochemolisi con tetraetilammonio (TEAH).....	95

6.4 Termochemolisi-GC/MS con TMAH delle frazioni acquose, ottenute dalla transesterificazione dei campioni umici, e dei residui solidi dopo transesterificazione e metanolisi. ....	99
---	----

6.5 Conclusioni .....	105
-----------------------	-----

## **CAPITOLO 7**

<b>STUDIO ESI/MS DEI CAMPIONI UMICI .....</b>	<b>113</b>
---	------------

7.1 Introduzione.....	113
-----------------------	-----

7.2 Studio del solvente e del “cone voltage” .....	114
--	-----

7.3 Caratterizzazione mediante ESI-MS dei campioni umici .....	118
--	-----

7.4 Spettrometria di massa tandem (ESI-MS/MS) ..	124
--	-----

## **CAPITOLO 8**

### **CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN COMPOST E DI SUE FRAZIONI A DIFFERENTE POLARITÀ**

8.1 Introduzione.....	127
-----------------------	-----

8.2 Analisi NMR .....	129
-----------------------	-----

8.3 Componente lipidica libera.....	131
-------------------------------------	-----

8.4 Componente identificata dopo transesterificazione e dopo metanolisi .....	138
---	-----

## **CAPITOLO 9**

<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>153</b>
--------------------------	------------

<b>Bibliografia.....</b>	<b>155</b>
--------------------------	------------

## **CAPITOLO I**

### **LA SOSTANZA ORGANICA DEL SUOLO**

#### **1.1 Introduzione**

Il suolo è una componente essenziale per l'equilibrio globale della biosfera, dei principali ecosistemi e per la produzione di biomassa. Esso costituisce il “substrato” per la maggior parte dei processi e delle attività biologiche, comprese quelle umane, e condiziona direttamente o indirettamente tutte le forme di vita terrestre (ANPA 2000).

Preservare la qualità del suolo e incrementarne la fertilità è di fondamentale importanza per la sopravvivenza dell'uomo e per sostenere la crescita demografica. Nei paesi industrializzati, però, per ottimizzare le produzioni agricole, in risposta alla maggiore domanda di mercato, è andato sempre più aumentando l'impiego di mezzi meccanici e chimici. Questo tipo di gestione ha come conseguenza il depauperamento del suolo, dovuto alla perdita di sostanza organica, e l'incremento dei rischi ambientali, legati alla permanenza nell'ambiente di residui xenobiotici e nella dispersione di fertilizzanti minerali che possono causare fenomeni di eutrofizzazione nelle acque superficiali e profonde delle zone sottoposte ad agricoltura industriale.

Il suolo purtroppo è una risorsa naturale fondamentale che non è rinnovabile nella scala temporale umana, pertanto ne è necessario un utilizzo sostenibile, in modo da trarre il massimo vantaggio produttivo oggi, senza compromettere tale opportunità alle generazioni future. Per questo motivo sono sempre più auspicabili cambiamenti nel management del suolo che prevedano la diminuzione dell'utilizzo di pesticidi, l'applicazione di fertilizzanti organici a base di sostanza organica naturale, piuttosto che sintetici, e la riduzione dell'intensità delle coltivazioni. Tuttavia, sebbene siano indubbi

gli effetti che i fertilizzanti organici hanno sullo sviluppo fisiologico e le rese di molte colture, è sconosciuto il meccanismo con cui si espletano tali effetti.

Affinché sia effettiva una gestione sostenibile del suolo ai fini della salvaguardia e valorizzazione del territorio, in particolar modo in ambienti contraddistinti da un delicato equilibrio tra uomo e natura, è dunque necessario capire che cos'è la sostanza organica del suolo, da dove deriva, come si trasforma e come si conserva. Tuttavia la complessità che caratterizza la sostanza organica, fa sì che la comprensione delle sue funzioni nel suolo e nell'ambiente può realizzarsi solo parallelamente all'approfondimento della sua natura e dei processi che ne sono alla base della formazione e della stabilità nel suolo.

## **1.2 La sostanza organica naturale (NOM)**

La sostanza organica naturale, o humus, è ubiquitaria nei suoli, nei sedimenti e nelle acque dove gioca un ruolo fondamentale in numerosi processi globali come la produttività biologica e i cicli del carbonio e dell'azoto. È importante nei vari comparti ambientali per la sua capacità di controllare la degradazione e la mobilità dei contaminanti organici, nonché la ritenzione ed il trasporto di metalli pesanti. Un suo depauperamento nei suoli provoca processi di degradazione ecologica quali l'erosione e la desertificazione.

La sostanza organica del suolo (SOM) è formata da una miscela eterogenea di residui organici (foglie, rami, deiezioni animali, etc.) che arrivano al suolo, dai composti sintetizzati dai microrganismi e dalle sostanze unificate. I residui organici sono costituiti da sostanze semplici come amminoacidi, zuccheri, acidi organici mono- e bicarbossilici

e composti a più alto peso molecolare come polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, lipidi e lignine.

Questi composti sono detti, nel loro insieme, composti non umici poiché sono riportabili a ben definite categorie di composti chimici (Kohl, 2000). Questi rappresentano la parte labile della SOM e sono destinati a subire, in tempi più o meno lunghi, processi evolutivi il cui andamento è condizionato dal tipo di ambiente in cui si trovano. Essi sono trasformati dall'attività dei microrganismi del suolo, che prima di tutto provvedono alla riduzione delle dimensioni dei residui vegetali grazie al rilascio di enzimi. Nella prima fase di decomposizione si ha una rapida perdita dei composti facilmente degradabili come zuccheri semplici, amminoacidi, molte proteine ed alcuni polisaccaridi che avendo alta solubilità nella soluzione del suolo possono essere facilmente idrolizzati dai microrganismi a composti semplici e utilizzati dagli stessi come fonte di energia. In uno stadio successivo vengono attaccati i composti più resistenti, come le cere, i grassi, la cellulosa e la lignina che, pertanto, persistono per lunghi periodi nel suolo.

Le sostanze umiche, invece, rappresentano la componente più stabile e recalcitrante della sostanza organica e sono costituite dai prodotti della degradazione chimica e biologica dei residui provenienti dai tessuti vegetali ed animali ed all'attività di sintesi dei microrganismi, che tendono ad associarsi in strutture organiche complesse le quali risultano essere più stabili e resistenti alla degradazione rispetto al materiale di partenza. La Frazione umica arriva a costituire fino al 65%, della SOM ed ha un tempo di residenza medio che varia nei diversi ecosistemi da alcune decine a diverse centinaia d'anni.

Le frazioni umiche sono strettamente correlate con le parti labili, non umiche, della sostanza organica, essendo direttamente coinvolte nei processi di accumulo, dinamica e stabilizzazione della sostanza organica stessa (Piccolo, 1996). Così la distinzione in sostanze non umiche e sostanze umiche, è stata recentemente messa in discussione da Sutton e Sposito (2005) i quali propongono che una definizione delle componenti umiche che sia rilevante ai fini degli studi scientifici, dovrebbe includere tutte le molecole strettamente associate alla Frazione umica e che non possono essere separate da essa senza alterarne le caratteristiche. Essi, partendo dal modello supramolecolare delle sostanze umiche (paragrafo 1.5), ritengono che se si riconosce che il materiale umico è un'associazione supramolecolare, non è più accettabile escludere dalla definizione e dallo studio dell'humus intere classi di composti solo perché possono essere identificate come biomolecole.

### **1.3 Frazione umica: caratteristiche chimiche.**

Le sostanze umiche si distinguono operativamente in acidi umici, acidi fulvici ed umine in base alle differenti caratteristiche di solubilità in alcali o acidi: gli acidi umici (HA) sono la Frazione che si solubilizza in soluzione alcalina ma che precipita in soluzioni acide ( $\text{pH} < 3$ ), gli acidi fulvici (FA) sono quella Frazione che si solubilizza sia in soluzioni alcaline sia in soluzioni acide e l'umina (HUM), infine, è la Frazione insolubile in qualsiasi condizione di pH (Stevenson, 1994).

In generale, acidi umici ed umina hanno dimensioni molecolari superiori a quelle degli acidi fulvici ed un minor contenuto in ossigeno, normalmente associato ad un più alto contenuto di carbonio. È stato calcolato che il rapporto ossigeno/carbonio (O/C) negli acidi umici è, mediamente, 0.50, mentre è 0.70 negli acidi fulvici. Tale differenza



è espressione di un più alto contenuto di gruppi carbossilici negli acidi fulvici rispetto agli acidi umici ed all'umina. Essa conferisce a queste componenti dell'humus una differente acidità totale, derivante dalla reazione acida di gruppi carbossilici ed alcolici, tale che per gli acidi fulvici l'acidità varia mediamente tra 640 e 1420 mol.kg<sup>-1</sup> di sostanza organica, mentre per gli acidi umici è compresa mediamente tra 560 e 890 mol.kg<sup>-1</sup> di sostanza organica (Stevenson, 1994).

Il rapporto idrogeno/carbonio (H/C) riflette il grado di insaturazione di acidi umici, fulvici ed umina e risulta essere approssimativamente 1.0 per i primi due e 1.5 per la terza, denotando, quindi, che acidi umici e fulvici hanno un grado di aromaticità più elevata dell'umina che presenta, invece, un maggiore contenuto di componenti alifatiche.

Tutte le componenti dell'humus si comportano come polielettroliti la cui caratteristica è una polidispersione sempre maggiore dell'unità (Stevenson, 1994), hanno proprietà anfifiliche e surfattanti e contengono funzioni radicaliche. I gruppi funzionali, che conferiscono tali caratteristiche sono gruppi carbossilici ed alcolici, sistemi amminici, ammidici, chetonici, cheto-acidi, aniridici, chinonici, idrochinonici, imminici, alifatici, esterei ed eterei.(Stevenson, 1994). Il loro insieme riflette la grande varietà di molecole che intervengono nella sintesi delle sostanze umiche.

#### **1.4 La struttura delle sostanze umiche.**

Nonostante tecniche di indagine sempre più avanzate abbiano permesso di ottenere informazioni sulle diverse componenti della SOM, le attuali conoscenze sulla struttura chimica delle sostanze umiche sono ancora incomplete. La maggiore difficoltà incontrata nel definire la struttura chimica e la reattività delle sostanze umiche deriva

dalla loro enorme eterogeneità chimica e variabilità conformazione, insieme alla complessa varietà delle reazioni chimiche coinvolte nella loro sintesi e delle caratteristiche ambientali in cui si formano.

I lavori iniziali che hanno cercato di elaborare un modello strutturale delle sostanze umiche partivano dall'assunzione che l'humus fosse composto principalmente dai prodotti ultimi delle reazioni di sintesi derivanti dai prodotti di degradazione delle piante. Da queste assunzioni si è sviluppato il modello "polimerico", in cui le molecole umiche sono viste come polimeri con strutture chimiche distinte e diverse da quelle dei materiali di partenza. I primi modelli così descrivevano le molecole umiche come macropolimeri eterogenei, costituiti da un nucleo centrale contenente sistemi policiclici aromatici legati a lunghe catene alifatiche mediante interazioni di tipo covalente (Kleinhempel, 1970), oppure polimeri eterogenei costituiti da subunità contenenti anelli aromatici polisostituiti con sistemi alifatici, polisaccaridici o polipeptidici, interagenti mediante deboli legami idrogeno (Schnitzer, 1972).

Un modello di questo tipo è quello a "gomitolo ripiegato" (Gosh e Schnitzer, 1980), in cui le sostanze umiche sono descritte come densamente raggomitolate ad alte concentrazioni, pH bassi ed alta forza ionica e come colloidali lineari e flessibili a basse concentrazioni, pH neutri e bassa forza ionica. Secondo questo modello, quando la concentrazione delle sostanze umiche in soluzione è bassa e il pH è costante, esse passano da una forma macropolimerica lineare ad una sferocolloidale rigida all'aumentare della forza ionica. Tale comportamento è ascrivibile alla capacità dei sali in soluzione di neutralizzare le cariche negative delle sostanze umiche e di favorire, quindi, aggregazioni idrofobiche intramolecolari. Al contrario, quando la forza ionica viene mantenuta costante, i macropolimeri umici in soluzione assumono una forma

lineare all'aumentare del pH, a causa delle repulsioni elettrostatiche tra le cariche negative che si generano per effetto dell'incremento di pH. Quando la concentrazione di sostanze umiche in soluzione è, invece, elevata, non si osservano variazioni conformazionali al variare di pH e forza ionica e le macromolecole umiche rimangono nella forma sferocolloidale rigida. Questo modello si basa su misure di tensione superficiale e di viscosità di sostanze umiche a differenti valori di pH e forza ionica, ed è stato elaborato utilizzando l'equazione di Flory e Fox, che è dedicata alla previsione del comportamento conformazionale di polimeri reali ad alto peso molecolare (Flory e Fox, 1951). Questo modello era perciò basato su una ipotesi non sufficientemente provata, e, inoltre non implica la spiegazione delle proprietà surfattanti delle sostanze umiche.

Le tecniche di indagine chimico-fisica messe a punto negli ultimi venti anni hanno consentito di migliorare la conoscenza non solo circa la composizione delle sostanze umiche e, quindi di spiegare le loro caratteristiche chimiche, ma anche circa l'individuazione delle proprietà conformazionali e, di conseguenza, delle caratteristiche strutturali.

Un numero crescente di studiosi ha evidenziato che le sostanze umiche sono costituite dai prodotti della parziale degradazione dei polimeri vegetali (Baldok e al., 1992; Hatcher e Spiker, 1988; Piccolo, 2001; Wershaw, 1986; Wershaw, 1994) tenuti insieme da legami non covalenti (Piccolo, 2002). I modelli elaborati a partire da queste considerazioni sono riportati in letteratura come modello degli aggregati supramolecolari (Piccolo 2001). Molte evidenze sperimentali supportano la validità del modello degli aggregati supramolecolari, che è più rappresentativo della struttura delle HS negli estratti di suolo, rispetto al modello dei polimeri umici.

Il primo modello conformazionale di questo tipo è stato elaborato da Wershaw (1986, 1993). Questi ha descritto le sostanze umiche come aggregati ordinati anfifilici di oligomeri interagenti mediante deboli forze di natura idrofobica, interazioni  $\pi$ - $\pi$  e legami ad idrogeno, capaci di formare strutture micellari simili alle membrane naturali, con una parte interna idrofobica ed una esterna idrofilica. Questi aggregati ordinati secondo il modello proposto possono assumere in soluzione una struttura a micelle mentre nei suoli possono assumere strutture simili alle membrane cellulari e aderire alle superfici dei minerali. Tale modello si basa su osservazioni sperimentali che evidenziano la possibilità di disaggregare acidi umici e fulvici in frazioni chimicamente differenti mediante l'uso di colonne di Sephadex (Wershaw e Pinckney, 1973), la capacità di soluzioni estraenti deboli, quali quelle contenenti metilisobutilchetone, di separare l'umina nelle sue componenti chimicamente differenziate (Wershaw, 1986) e la possibilità di incrementare la solubilità di pesticidi di natura idrofobica in presenza di sostanze umiche (Wershaw et al., 1969). Tuttavia, questo modello micellare o a membrana considera le sostanze umiche come sistemi ordinati, in cui un nucleo interiore completamente idrofobico è circondato da un insieme di oligomeri di natura idrofilica.

Engelbrechtson e von Wandruszka, (1994), continuando a sostenere la validità delle interazioni deboli nello stabilizzare la conformazione in soluzione delle sostanze umiche, hanno proposto un modello conformazionale dove il nucleo interiore idrofobico delle sostanze umiche contiene anche dei microambienti polari. La possibilità che microambienti polari possano essere presenti in un ambiente completamente idrofobico è giustificata dalla disposizione completamente casuale dei gruppi polari nelle sostanze

umiche e dalla presenza di molecole d'acqua che neutralizzano le cariche elettriche eventualmente presenti in tali microambienti.

Questi modelli sono stati rielaborati da Piccolo et al. (1996a,b). Essi hanno verificato come le alte dimensioni molecolari delle sostanze umiche, ipotizzate da Gosh e Schnitzer (1980) e considerate importanti nei modelli di Wershaw (1986) e di Engbertson e von Wandruszka (1994), siano solo apparenti. Usando la cromatografia ad esclusione molecolare, sia a bassa (LPSEC) che ad alta prestazione (HPSEC), questi autori hanno mostrato che le dimensioni molecolari apparenti delle sostanze umiche diminuiscono drasticamente quando piccole quantità ( $<10^{-6}$  M) di HCl o di semplici acidi organici ( $10^{-7}$  M) sono aggiunte alla fase mobile dell'HPSEC, mantenendo costante la forza ionica, o alle soluzioni umiche prima dell'analisi HPSEC.

Questo comportamento non è invece osservato quando vengono aggiunti acidi organici a polimeri reali quali polisaccaridi e polistirensulfonati a conferma della natura non polimerica delle sostanze umiche. Inoltre gli spettri UV delle sostanze umiche trattate con acidi organici mostrano ipocromismo (diminuzione dell'assorbanza dovuta all'incremento della distanza tra i cromofori). Se gli acidi umici fossero dei polimeri covalenti, a forza ionica costante, una diminuzione del pH ne provocherebbe un raggomitamento, con conseguente aumento dell'assorbività molare e dell'intensità dei cromatogrammi rispetto ai cromatogrammi controllo. Al contrario, la diminuzione dell'assorbanza è evidenza che l'assorbività molare totale del materiale umico eluito è minore di quella del controllo. Questo fenomeno, quindi, può, essere attribuito alla separazione dei gruppi cromofori, piuttosto che alla compattazione delle molecole umiche in gomitoli. Di conseguenza le dimensioni apparenti delle sostanze umiche non

cambiano perchè raggomitano, come suggerito dal modello polimerico, ma cambia per la disaggregazione di aggregati di molecole più piccole.

Inoltre gli effetti degli acidi carbossilici e minerali su frazioni umiche con differente idrofobicità, indicano che la distruzione degli aggregati è maggiore quanto maggiore è l'idrofobicità dei materiali umici che sono combinati con molecole organiche contenenti sia segmenti idrofobici che idrofilici. Questo risultato suggerisce che i materiali umici sono tenuti insieme da interazioni idrofobiche, le quali sono facilmente distrutte quando semplici molecole organiche penetrano all'interno delle fasi apolari delle sostanze umiche e delle conseguenti repulsioni elettrostatiche tra le cariche negative dei gruppi carbossilici.

Questi ed altri risultati (Piccolo et al., 1996 b, c; Piccolo e Conte, 2000; Pfeifer et al., 2001; Piccolo et al., 2001 a, b; Piccolo et al., 2002; Piccolo e Spiteller, 2003) indicano che le sostanze umiche in soluzione si comportano come autoassociazioni supramolecolari di molecole eterogenee relativamente piccole (<1000 Da), tenute insieme da forze di legame di natura prevalentemente idrofobica. La stabilità termodinamica di tali conformazioni in soluzione è attribuita alla tendenza, guidata dall'entropia, ad escludere molecole d'acqua dalle associazioni umiche, con una diminuzione dell'energia molecolare totale (Piccolo, 2002).

### **1.5 Origine delle sostanze umiche.**

La formazione delle sostanze umiche è un aspetto ancora poco capito della chimica dell'humus. Molti meccanismi sono stati ipotizzati e ulteriori ricerche sono necessarie per chiarire questo punto.

I primi meccanismi ipotizzati partivano dal concetto che le sostanze umiche fossero dei polimeri derivanti da reazioni di sintesi secondaria a partire dai prodotti di degradazione delle piante. Così uno dei primi meccanismi proposto, implicava delle polimerizzazioni casuali e condensazioni di lipidi con zuccheri e amminoacidi, non catalizzate da enzimi, secondo lo schema della reazione di Maillard. La reazione inizia con la formazione di una base di Schiff tra il carbonile di uno zucchero e l'azoto di un amminoacido o di un ammonio. Il risultante derivato N-sostituito è soggetto poi ad una complessa serie di reazioni di disidratazione, riarrangiamento e condensazione che dà origine a prodotti di frammentazione e a polimeri scuri strutturalmente complessi (Hedges, 1988). La maggiore obiezione a questa teoria è che le reazioni proposte procedono piuttosto lentamente alle temperature trovate sotto le normali condizioni del suolo.

Inoltre le condizioni abiotiche non sono usuali in un sistema come quello del suolo in cui nasce e prolifera una vasta microflora di cui fanno parte batteri e funghi. Così partendo dall'idea che i microorganismi siano in grado di sintetizzare molecole complesse, si è cercato di individuare tra questi prodotti biosintetici i precursori delle molecole umiche. Le melanine, per esempio, per la loro complessità chimico-fisica (Nicolaus, 1968) sono ritenute molto simili alle sostanze umiche, tanto da essere state considerate probabili precursori dell'humus (Haider et al., 1975). Reazioni di degradazione, in questo caso, sembrano essere responsabili della formazione della SOM (Saiz-Jimenez, 1996). Anche i microorganismi fototropici, come cianobatteri ed alghe, con meccanismi analoghi, sono in grado di sintetizzare polisaccaridi, glicoproteine ed altri eteropolimeri che fungono, oltre che da substrato per batteri e funghi, anche da precursori delle sostanze umiche.

I suoli sono anche il sito in cui crescono e si sviluppano licheni, briofite e piante superiori. I licheni sono in grado di produrre un gran numero di sostanze intracellulari, quali ossalati, fenoli ed antrachinoni, ed extracellulari, quali polioli, monosaccaridi, polisaccaridi ed altri carboidrati a basso peso molecolare, proteine, amminoacidi, carotenoidi e vitamine (Hale, 1983). A causa della bassa distribuzione dei licheni, del loro lungo ciclo vitale (50-100 anni) e dell'attività antimicrobica dei loro prodotti secondari, è difficile considerarne le strutture come importanti precursori delle sostanze umiche. Tuttavia, dal momento che i loro prodotti sono in grado di formare complessi stabili con i cationi presenti nel suolo favorendo così la degradazione delle parti minerali, possono essere considerati sicuramente importanti per l'inserimento nel ciclo del carbonio di tutte quelle sostanze organiche che derivano da altre fonti e che, complessate stabilmente con le parti inorganiche del suolo, non sarebbero in grado di prendere parte direttamente alle reazioni di sintesi delle sostanze umiche.

Rispetto ai licheni, le briofite hanno una maggiore distribuzione sul suolo ed i loro prodotti, quali polisaccaridi, proteine, lipidi, carotenoidi, terpenoidi e flavonoidi, sembrano partecipare direttamente alla sintesi dell'humus.

Sistemi complessi come resine, tannini, polimeri fenolici, lignine, sporopollenine, cutine e subarine sono, invece, oltre a quelli già citati, i prodotti di degradazione delle piante superiori (Saiz-Jimenez, 1996). In particolare, la biodegradazione delle lignine è stata per lungo tempo considerata il principale meccanismo di formazione dell'humus (ipotesi della lignina): in accordo con tale ipotesi, la lignina viene utilizzata incompletamente dai microrganismi (le modificazioni apportate alla lignina dai microrganismi comprendono la perdita dei gruppi metossilici con la generazione di O-idrossifenoli e la ossidazione di catene alifatiche per formare



gruppi carbossilici) dopodichè il materiale modificato è soggetto a ulteriori cambiamenti fino a produrre le prime molecole umiche. Questa teoria si basa sulla considerazione che molti batteri sono in grado di demetilare la lignina, senza ulteriormente degradarla (Haider et al., 1975), consentendo in tal modo la successiva ossidazione dei gruppi funzionali esposti. Tuttavia in natura esistono meccanismi per la completa decomposizione della lignina e la capacità di degradazione da parte dei microrganismi del suolo è stata sottostimata.

Un'ulteriore meccanismo proposto prevede che le aldeidi fenoliche e gli acidi rilasciati dalla lignina durante l'attacco microbico intraprendono conversione enzimatica a chinoni, i quali polimerizzano in presenza o assenza di amminocomposti per formare macromolecole simili ai modelli polimerici proposti per le sostanze umiche. Un'altra ipotesi propone lo stesso meccanismo tranne che per il fatto che i polifenoli possono derivare dalla degradazione di composti diversi dalla lignina.

Sebbene l'accumulo progressivo di materiale aromatico sia stato per lungo tempo considerato il fenomeno prevalente nel processo di umificazione, recenti investigazioni sulla SOM hanno evidenziato anche l'importanza del contributo dei costituenti alifatici e, in particolare, dell'esterificazione come modalità di legame per i biopoliesteri organici durante il processo di umificazione (Grasset e Amblès, 1998): i composti alchilici, derivanti dalla decomposizione dei residui vegetali e dalla re-sintesi microbica, vengono progressivamente incorporati in frazioni più stabili della SOM e si legano in forme estremamente resistenti alla degradazione chimica (Jambu et al., 1993; Lichtfouse et al., 1995; Almendros et al., 1996), con le componenti idrofiliche rilasciate dalla biodegradazione dei tessuti vegetali intrappolate nei domini idrofobici dell'humus e protette così da ulteriori degradazioni (Spaccini et al., 2000). Nei suoli si possono

distinguere diverse fonti di composti alifatici, come i lipidi liberi, i biopolimeri non idrolizzabili quali cutani e suberani, ma sono soprattutto i biopoliesteri quali la cutina e la suberina, che sono i materiali polimerici che coprono rispettivamente le parti aeree e quelle sotterranee delle piante, ad essere correlati alle proprietà derivanti dai legami esterei nella sostanza organica del suolo (Almendros e Sanz, 1991; Naafs e van Bergen, 2002; Nierop, 1998; Nierop et al., 2003).

Tutti questi meccanismi proposti assumono che le sostanze umiche siano polimeri biologicamente sintetizzati a partire dalle componenti degradate dei tessuti delle piante. Comunque le sostanze umiche derivano da cellule morte e non da biosintesi cellulare, come avviene per le altre molecole. La rapida degradazione e decomposizione dei biopolimeri rilasciati dalle lisi cellulari è attualmente un ben accettato processo sia da un punto di vista biologico sia termodinamico (Jenkinson, 1981; Haider, 1987; Clapp e Hayes, 1999; Spaccini et al., 2001).

In contrasto a questi meccanismi proposti le più recenti acquisizioni circa la struttura delle sostanze umiche (paragrafo 1.5), suggeriscono la necessità di rivedere il meccanismo della loro formazione e di rivedere il concetto di umificazione, che non può prescindere da una sistematica e sistemica indagine circa la natura, la struttura e la conformazione di queste sostanze. L'ipotesi di un giusto equilibrio tra i contributi della parziale degradazione dei prodotti di tutti gli organismi che vivono e proliferano nel suolo, inoltre, sembra essere l'idea più accreditata e promettente per giustificare la complessità delle sostanze umiche.

## **1.6 Ruolo delle sostanze umiche nella fertilità dei suoli.**

Le sostanze umiche agiscono sulla crescita delle piante sia in modo indiretto, influenzando le proprietà fisiche, chimiche e biologiche dei suoli, sia in modo diretto agendo sulla fisiologia delle piante.

Fisicamente le HS migliorano la qualità dei suoli garantendo una buona porosità, che aumenta l'aerazione e il drenaggio del suolo, garantendo una buona struttura (Celi, 1992) e aumentando la ritenzione idrica (Piccolo et al., 1996e). Biologicamente agiscono sull'attività e composizione della comunità microbica che provvede a rendere disponibili i nutrienti per le piante secondo lo schema del "microbial loop". Chimicamente possono solubilizzare grazie alle loro proprietà chelanti, le forme nutrizionalmente attive di ferro (Stevenson, 1991), molibdeno e boro (Yermihayu et al., 1988). Inoltre sono fonte di macronutrienti quali azoto, fosforo e zolfo.

La conservazione di una buona struttura del suolo ha delle implicazioni ambientali connesse anche con l'erosione: lo sfaldamento degli aggregati e il ruscellamento in seguito a violente piogge portano, infatti, alla perdita degli strati superficiali più ricchi in materiale nutritivo causando l'impoverimento del suolo, favorendo fenomeni di eutrofizzazione e interrimento di canali e fiumi. Inoltre l'acqua trattenuta dalla sostanza organica influenza notevolmente il regime di temperatura: il suolo, infatti, si raffredda e si riscalda più lentamente quando il contenuto di acqua è elevato.

Numerosi studi compiuti negli ultimi anni, però, hanno messo in evidenza come le sostanze umiche siano in grado di influenzare positivamente la crescita e lo sviluppo delle piante in modo diretto. I loro effetti sembrano essere maggiormente esercitati sulle funzioni delle membrane cellulari, stimolando la nutrizione minerale (Visser, 1986; Varanini e Pinton, 1995, 2001), sulla crescita e sviluppo della pianta agendo come

sostanze simili agli ormoni, o stimolando la respirazione (Vaughan e Malcom, 1985; Nardi e al., 1996).

La stimolazione dell'assorbimento dei nutrienti indotto dalle sostanze umiche è risultato particolarmente evidente a livello dell'assorbimento del nitrato. Questo effetto positivo sull'assorbimento dell' $\text{NO}_3^-$  può esplicarsi promuovendo l'espressione di proteine carrier (Vaughan et al., 1985), e modificando alcuni parametri cinetici (Cacco et al., 2000). Era già stato mostrato che le HS stimolano la sintesi di proteine carrier nelle radici di piante d'orzo a livello post-trascrizionale (Dell'Angola e Ferrari, 1971; Dell'Angola e al., 1981). Queste conclusioni sono state recentemente confermate determinando la quantità di RNA, dopo il trattamento di plantule di mais con frazioni a basso peso molecolare (Nardi et al., 2000b). Ma gli effetti delle sostanze umiche sull'assorbimento dell' $\text{NO}_3^-$  sono stati spiegati anche considerando che queste sostanze possono indurre modificazioni genomiche (Attinà e al., 1992) o che le componenti a basso peso molecolare possono interagire con le proteine carrier, modulando l'assorbimento del  $\text{NO}_3^-$ . Questa ipotesi è avallata dall'osservazione che le componenti umiche a basso peso molecolare possono raggiungere l'apoplasto ed interagire con la membrana plasmatica delle radici (Vaughan, 1986) e delle cellule di carote in coltura (Muscolo e Nardi, 1999). Componenti a basso peso molecolare potrebbero anche stimolare l'attività ATPasica delle membrane plasmatiche (Varanini et al., 1993), così da determinare un incremento del gradiente elettrochimico che potrebbe anche essere responsabile della stimolazione dell'assorbimento del nitrato (Pinton et al., 1999a)

Tra gli effetti biologici indotti sul metabolismo vegetale, particolare attenzione è stata posta nello studio riguardante l'attività ormone-simile delle sostaze umiche (Muscolo et al., 1993; Muscolo et al., 1999). Già in una serie di lavori pubblicati tra il

1914 e il 1920 (Bottomley, 1914a,b;1917,1920), veniva mostrato che le HS aumentano la crescita delle piante per mezzo di sostanze chiamate “auximoni”, una conclusione che è stata successivamente ed indipendentemente raggiunta da altri autori (Hillitzer, 1932; Chaminade *et* Boucher, 1940).

Più recentemente l'attività ormonale delle sostanze umiche è stata studiata nei processi di crescita e differenziazione cellulare, utilizzando diversi modelli vegetali (Muscolo *et al.*,1993). I numerosi studi eseguiti in vivo hanno permesso di evidenziare che le frazioni umiche a basso peso molecolare ed elevata acidità hanno attività auxino simile e sono in grado di interferire con vari processi metabolici (Piccolo *et al.*,1992; Muscolo *et al.*,1998; Muscolo e Nardi,1999). L'aggiunta di composti umici di piccole dimensioni molecolari in bassi valori di concentrazione stimola la crescita di radici in talee foliari (O'Donnel, 1973; Nardi *et al.*, 1994). Altri studi hanno mostrato che acidi umici estratti da lignite hanno un'azione giberellino-simile sui germogli di avena, radicchio, pepe e lattuga (Petrovic *et al.*, 1992), mentre Poapst e Schnitzer (1971) hanno riportato prove che gli acidi umici possono interagire sinergicamente o antagonisticamente con vari tipi di regolatori della crescita vegetale. Altri studi hanno dimostrato la presenza, in acidi umici congelati e liofilizzati, di sostanze simili sia alle gibberelline che agli inibitori della crescita (Cesenave De Sanfilippo *et al.*, 1990).

Gli effetti delle HS sulla respirazione delle cellule vegetali, nonostante la loro rilevanza, ha ricevuto poca attenzione negli anni recenti. In questo contesto, numerosi lavori mostrano che sostanze umiche di varia origine sono capaci di aumentare la respirazione delle piante (Vaughan e Malcom, 1985), dove l'effetto delle componenti fulviche è molto più marcato di quelle umiche. Questi risultati sono stati variamente interpretati. La possibilità che la stimolazione possa dipendere dalla proprietà di queste

sostanze di agire come substrati respiratori non è più a lungo accettabile (Nardi, 2002). Inoltre, la stimolazione del consumo di ossigeno è solo dell'ordine del 25-30% e ottenuta con piante intatte, quali il pomodoro (Sladky, 1959) o porzioni del fittone di bietola (Vaughan, 1967). Tuttavia questo incremento potrebbe pure essere legato a una stimolazione dell'attività perossidasi da parte del materiale umico (Muscolo et al., 1993).

Quest'argomento è stato pure affrontato utilizzando mitocondri isolati di fegato di ratto. È stato infatti dimostrato che le molecole umiche parzialmente disaccoppiano la fosforilazione ossidativa dopo brevi tempi di esposizione (Visser, 1987; Flaig, 1968). Questi risultati sono stati tentativamente spiegati suggerendo che il parziale disaccoppiamento renda più disponibile il fosfato inorganico (senza esaurire l'ATP cellulare) che sarebbe poi utilizzato in alcune reazioni di fosforilazione legate alle vie biosintetiche. Risultati più recenti mostrano che le sostanze umiche determinano un decremento (30-40%) dell'ATP cellulare, senza per questo influenzare il consumo di ossigeno (Nardi et al., 1991). Tuttavia i dati sperimentali e le considerazioni espresse non forniscono ancora un quadro chiaro sugli effetti dei materiali umificati sulla respirazione e sulla loro eventuale interferenza, diretta o indiretta, con le funzioni mitocondriali. Pertanto ulteriore lavoro sperimentale è necessariamente richiesto prima di poter trarre una più sicura conclusione.

La mancanza di una dettagliata conoscenza circa la composizione e la struttura delle sostanze umiche rende molto difficile identificare la relazione tra la struttura e l'attività di queste sostanze. Lo studio di questa relazione è complicato dalla presenza di altre molecole come ormoni di origine microbica. Così il tentativo di mettere in relazione questi due aspetti ha prodotto risultati contrastanti (Nardi, 2002). Tuttavia è

stato suggerito che i gruppi carbossilici ed idrossilici delle sostanze umiche giochino il ruolo più importante nel determinare la loro attività (Mao et al., 1972; Malcom and Vaughan, 1978; Pflug and Ziehm, 1981), ma il meccanismo attraverso il quale esercitano i loro effetti devono essere ancora chiariti (Vaughan and Malcom, 1985). Componenti a basso peso molecolare apparente hanno mostrato di essere particolarmente attive, sebbene le componenti con peso molecolare apparentemente più alto abbiano una residua attività (Ladd e Butler, 1971; Malcom e Vaughan, 1979).

È stato suggerito (Visser 1986) che le componenti fulviche e le componenti umiche a basso peso molecolare possiedano una maggiore capacità di legare metalli per il maggior numero di gruppi funzionali che spiegherebbe come migliorino l'assimilazione dei nutrienti ed il metabolismo delle piante. Inoltre i complessi humus-nutrienti formati con le componenti a basso peso molecolare delle HS entrerebbero più facilmente nelle cellule rispetto alle componenti a peso molecolare apparentemente più alto che invece, come riportato, si legherebbero strettamente alle pareti cellulari (Vaughan, 1986). Questi risultati sono in linea con quelli ritrovati da Nardi ed altri (1996, 2000a), che mostrarono che le HS con peso molecolare apparente più alto, inducono un aumento del tasso di stimolazione degli enzimi implicati nei processi metabolici legati alla crescita della pianta e nella differenziazione. Da queste osservazioni è stato suggerito che le componenti a basso peso molecolare agiscono sul simplasto e influenzino direttamente il metabolismo delle piante mentre le componenti con peso molecolare apparente più alto, operano maggiormente sulla parete cellulare influenzando la differenziazione ed i processi di crescita all'apoplasto (Nardi et al., 2002).

Inoltre, il modello supramolecolare proposto per le HS apre ad altre possibilità. Partendo dalla considerazione che le radici delle piante interagiscono con il terreno principalmente mediante la secrezione di composti organici, in particolare degli acidi del ciclo di Krebs, la nuova visione della natura chimica delle sostanze umiche implica che al variare della composizione degli essudati radicali, si possono rilasciare molecole umiche con una struttura capace di influenzare la permeabilità delle membrane radicali e stimolare sia l'assimilazione di nutrienti che alcune funzioni fisiologiche delle cellule vegetali. Questa possibilità è suggerita dalla facile variazione conformazionale delle sostanze umiche, già evidenziata nel paragrafo precedente, al semplice contatto con minime quantità di acidi organici simili a quelli presenti negli essudati radicali (Piccolo et al., 1999; Cozzolino et al., 2001; Piccolo et al., 2003). In più, il possibile scambio di informazioni tra il sistema suolo-sostanze umiche-radice, attivato dall'emissione di essudati radicali, è stato verificato in vivo, estraendo le sostanze umiche dal suolo non più con metodiche classiche mediante soluzioni di basi forti, ma utilizzando direttamente essudati radicali. Utilizzando essudati radicali appartenenti a specie sia agrarie che forestali (*Zea mais*, *Picea abies* e *Pinus sylvestris*) si è potuto mobilitare frazioni organiche e/o umiche variamente dotate di attività ormone-simile (Nardi et al., 2000b).

Un avanzamento delle conoscenze attuali sulla fertilizzazione organica deve perciò basarsi su uno studio sperimentale dettagliato in cui le HS siano caratterizzate in dettaglio e messe in relazione con la stimolazione delle funzioni nutritive e fisiologiche delle cellule vegetali al fine di ottenere una plausibile correlazione struttura-attività.



## **CAPITOLO II**

### **OBIETTIVO DELLA TESI E DISEGNO SPERIMENTALE.**

La mancanza di una dettagliata conoscenza circa la composizione e la struttura del materiale umico, è il principale ostacolo ad una piena comprensione dell'attività biologica svolta da queste complesse sostanze. La loro attività, però, è di rilevante importanza in quanto determina la qualità fisica, chimica e biologica del suolo. Comprendere la struttura delle HS, quindi, risulta necessario per una corretta gestione e valorizzazione delle risorse agro-forestali e delle più ampie implicazioni ecologiche che ha il suolo in quanto comparto ambientale.

L'attività delle HS è funzione non solo della loro composizione chimica, ma anche delle loro dimensioni molecolari ed ambedue controllano le trasformazioni biologiche e le funzioni ecologiche della sostanza organica. Allo stato dell'arte le indicazioni sono che le componenti a basso peso molecolare influenzano direttamente il metabolismo delle piante agendo a livello del simplasto, mentre le componenti con dimensioni molecolari nominali maggiori, operano maggiormente sulla parete cellulare influenzando la differenziazione ed i processi di crescita all'apoplasto.

Per un avanzamento delle conoscenze attuali sull'attività delle sostanze umiche, perciò, è necessario avere maggiori informazioni sulla composizione e la struttura delle diverse componenti umiche a differenti dimensioni molecolari.

L'obiettivo principale di questa tesi, quindi, è la caratterizzazione a livello molecolare e conformazionale di componenti umiche a differenti dimensioni.

A tal fine abbiamo provveduto all'estrazione e purificazione di un acido umico da un suolo vulcanico e abbiamo separato, mediante cromatografia ad esclusione molecolare ad alta pressione (HPSEC), delle frazioni a diverse dimensioni molecolari nominali. Queste frazioni ottenute dall'HPSEC e l'acido umico di partenza titolato a pH 7.2, sono caratterizzate a livello molecolare con le metodologie più avanzate in questo campo di ricerca.

In passato la caratterizzazione molecolare delle HS avveniva con metodi degradativi drastici, che non consentivano l'identificazione delle reali componenti ma solo dei prodotti di degradazione. Queste tecniche infatti determinano l'alterazione e la trasformazione di molecole labili in strutture molto diverse da quelle originali. In questa tesi, invece, utilizziamo una procedura atta ad identificare, dopo una serie di estrazioni e di blande reazioni idrolitiche, le componenti di classi molecolari che realmente costituiscono la complessa struttura delle sostanze organiche. Da questa procedura, dettagliatamente descritta nel capitolo 3 (materiale e metodi), sono ricavate dopo ciascuna reazione idrolitica una Frazione di composti solubili in solventi organici ed una Frazione solubile in acqua.

L'analisi delle frazioni solubili in solventi organici è eseguita mediante gas cromatografia-spettrometria di massa (GC/MS). Questa tecnica consente l'identificazione dei composti estratti, fornendo dati circa la loro struttura, composizione elementare e peso molecolare. L'utilizzo di rette di taratura, costruite con concentrazioni note di standard rappresentativi dei composti presenti nei campioni, consente invece l'analisi quantitativa dei singoli composti di ogni Frazione analizzata alla GC/MS, contribuendo ad un'accurata caratterizzazione della composizione delle frazioni liposolubili.

Informazioni strutturali sui residui solidi finali e sulle frazioni solubili in acqua, risultanti dai vari passaggi della procedura di frazionamento, sono invece ottenute con una tecnica di pirolisi accoppiata alla GC-MS, che viene eseguita contemporaneamente ad una reazione di metilazione con tetrametilammonio (termochemolisi), e con la tecnica di spettrometria di massa in fase liquida con interfaccia ad elettrospray (ESI/MS).

La pirolisi eseguita contemporaneamente alla reazione con tetrametilammonio favorisce la volatilizzazione e la cromatografia di composti polari abbondanti nelle sostanze umiche, offrendo dei risultati migliori rispetto alla pirolisi tradizionale. Particolare importanza è data all'ESI-MS in quanto l'elettrospray costituisce una tecnica di ionizzazione "soft". Essa permette di ionizzare le molecole umiche senza frammentarle, consentendo di ottenere informazioni più utili, rispetto alle tecniche classiche, sulle effettive dimensioni molecolari medie e pesate delle molecole che compongono le sostanze umiche. Per la prima volta questa tecnica è utilizzata per studiare frazioni di sostanze umiche ben più omogenee del materiale di partenza ottenute prima da una separazione HPSEC preparativa e poi da una serie di reazioni non distruttive. Sulle frazioni che risultano più complesse è effettuata una ulteriore separazione mediante HPSEC analitico "on-line" alla ESI-MS.

L'ESI/MS è utilizzata, oltre che per le frazioni acquose e residui solidi, anche per la determinazione delle dimensioni molecolari dell'acido umico e delle frazioni HPSEC non frazionate analiticamente. Inoltre, con la spettrometria di massa tandem (ESI/MS-MS) si è provveduto alla frammentazione di alcuni ioni molecolari tentando di risalire alla formula di struttura delle molecole originali.

Un ulteriore contributo alla comprensione della distribuzione molecolare delle frazioni HPSEC è dato dalla spettroscopia di risonanza magnetica nucleare al carbonio-13 in fase solida (CPMAS- $^{13}\text{C}$ -NMR) (Conte et al., 2004)

Inoltre sull'acido umico iniziale e sulle frazioni HPSEC, sono eseguite due diverse termochemolisi che utilizzano come agente alchilante l'una l'idrossido di tetrametilammonio, l'altra l'idrossido di tetraetilammonio, che costituisce un agente alchilante meno reattivo del primo. Così confrontando i risultati ottenuti con i due diversi reagenti è possibile distinguere tra molecole legate strutturalmente alla matrice umica per mezzo di legami esterei e molecole non legate strutturalmente, inoltre è possibile distinguere tra molecole con gruppi metilici preesistenti alla metilazione ad opera del reagente metilante. Questi risultati possono essere confrontati qualitativamente con quelli ottenuti dal frazionamento chimico sequenziale, costituendo una tecnica analitica alternativa, semplice e di veloce applicazione.

Infine il frazionamento analitico e la spettroscopia NMR sono utilizzati per caratterizzare della sostanza organica da riciclo delle biomasse (compost) e sue frazioni a diversa polarità. La sostanza organica da riciclo delle biomasse è ampiamente utilizzata in agricoltura per migliorare la qualità dei suoli, oltre che per superare il problema dello smaltimento dei rifiuti.

La composizione della materia organica di questi materiali è molto complessa, così come nei suoli. La tecnica di frazionamento analitico utilizzata per i campioni umici, accoppiata con metodi analitici spettroscopici, può essere un approccio utile anche per queste sostanze. Nello studio del compost e delle sue frazioni, ci limiteremo alla caratterizzazione mediante GC/MS delle frazioni liposolubili ottenute dal frazionamento chimico sequenziale. Anche se queste frazioni costituiscono solo una

minore componente della materia organica, è stato mostrato che giocano un ruolo essenziale nell'accumulo e la stabilizzazione della SOM (Augris *et al.*, 1998) e possono quindi fornire informazioni utili sull'intero campione di materiale.

## **CAPITOLO 3**

### **MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Estrazione e purificazione dell'acido umico.**

L'acido umico (HA) utilizzato in questo lavoro di tesi è stato isolato con metodi standard (Piccolo, 1988) da un suolo campionato nella caldera vulcanica del lago di Vico, vicino Roma (Italia), classificato come Allic Fulvudand. Brevemente, 200 g di suolo seccato all'aria e vagliato a 2mm, sono sospesi in rapporto 1:5 (w/v) in 500 ml di una soluzione 0.5 M di NaOH e 0.1 M di  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . Dopo agitazione per 12 h in atmosfera di azoto, la miscela viene centrifugata a 4000 rpm per 20 minuti così da separare la fase solida dall'estratto alcalino. Dopo filtrazione dell'estratto alcalino su lana di vetro, gli acidi umici (HA) vengono precipitati con HCl al 37 % fino a pH 1.0. Una successiva centrifugazione e filtrazione su lana di vetro, serve per separare gli acidi fulvici (FA), rimasti nel surnatante, dagli HA.

La purificazione degli acidi umici viene effettuata mediante tre processi di dissoluzione in NaOH 0.1 M e riprecipitazione a pH 1.0 per addizione di HCl al 37%. Dopo ogni processo di dissoluzione/riprecipitazione il surnatante viene allontanato per centrifugazione a 4000 rpm per 20 minuti. Gli acidi umici così trattati sono ulteriormente purificati mediante agitazione per 36 h in una soluzione 0.5% di HCl/HF

per allontanare gli eventuali silicati ancora presenti, dializzati (tubi da dialisi Spectrapore 3, cut-off 3500 Da) in acqua distillata fino a scomparsa di NaCl e infine liofilizzati.

### **3.2 Separazione di frazioni umiche mediante cromatografia ad esclusione molecolare in alta pressione**

L'HA isolato e purificato è stato preliminarmente titolato a pH 7.2 con una soluzione acquosa di KOH 0.5 M sotto atmosfera d'azoto ed agitazione magnetica in un titolatore automatico (VIT 90 Videotitrator, Radiometer, Copenhagen). Dopo aver raggiunto il pH costante di 7.2, la soluzione contenente umato di potassio (HA) è lasciata sotto titolazione per due ore, filtrata attraverso filtri in microfibre di vetro (Whatman GF/C) e liofilizzata.

Per la cromatografia HPSEC preparativa è stata usata una colonna Biosep SEC-S-2000 (300 mm di lunghezza e 21.2 mm di diametro interno) preceduta da una precolonna Biosep SEC-S-2000 (78 mm di lunghezza e 21,2 mm di diametro interno) fornite da Phenomenex. La separazione in continuo è resa possibile grazie ad un sistema costituito da una pompa Gilson 305, un autocampionatore Gilson modello 231 ed un collettore di frazioni della Gilson modello FC205, mentre un UV detector modello 116 della Gilson è utilizzato per rilevare in continuo l'assorbanza a 280 nm. Per registrare automaticamente tutte le corse cromatografiche è utilizzato il software Unipoint della Gilson.

La fase mobile utilizzata per l'HPSEC è una soluzione acquosa di NaCl/NaN<sub>3</sub> (2.89 g L<sup>-1</sup>/0.3 g L<sup>-1</sup>) ed è stata utilizzata anche per solubilizzare l'umato di potassio in vials di 20 ml ad una concentrazione di 0.6 g.L<sup>-1</sup> prima di ogni iniezione (5 ml) con

l'autocampionatore. Il flusso di eluizione è tenuto a  $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Le frazioni raccolte sono successivamente dializzate contro acqua dializzata in tubi da dialisi Spectropore 3 (cut-off 3500 Da) ed infine liofilizzate. Per la calibrazione della colonna HPSEC in intervalli dimensionali sono stati utilizzati come standard dei polistirensulfonati della Chemthek analytika s.r.l. aventi i seguenti pesi molecolari: 6780 Da, 16800 Da, 32000 Da e 123000 Da

### **3.3 Compost e sue frazioni a diversa polarità**

Il compost da rifiuti urbani utilizzato in questo lavoro è prodotto meccanicamente su scala industriale dalla Gesenu S.p.A. in Pietralmina (Perugia). Le matrici utilizzate per la preparazione della miscela iniziale sono residui dell'industria di lavorazione del tabacco (15%), residui della manutenzione del verde ornamentale (30%) e la Frazione organica da raccolta differenziata dei residui solidi urbani (55%). Il compostaggio è condotto sotto condizioni aerobiche e richiede una fase termofila di circa 28 giorni, durante i quali la miscela è soggetta a "turning" giornaliero, seguito da una fase di "curino" in pile per approssimativamente altri 3 mesi.

Dal compost finale sono state estratte, dal gruppo di ricerca del prof. Gigliotti (Università di Perugia), le frazioni a diversa polarità che sono state fornite ai fini di una caratterizzazione molecolare. La preparazione di queste frazioni sono condotte come segue. Il compost è posto in contatto con acqua deionizzata e degassata in un rapporto di estrazione di 1:5 w/v per 24 ore a temperatura ambiente e in seguito centrifugato a 5000 rpm. Il supernatante è filtrato attraverso filtro in microfibra di vetro  $0,7 \mu\text{m}$  e filtro in membrana  $0.45 \mu\text{m}$  per ottenere la DOM totale estratta.

La DOM è ulteriormente separata in due frazioni definite operazionalmente per mezzo di resine di Amberlite XAD-8 e XAD-4. La DOM estratta è acidificata a pH 2 e passata attraverso le resine XAD-8 e XAD-4. La Frazione organica ritenuta dalla resina XAD-8 è recuperata con 0.1N NaOH e passata attraverso una resina AG MP-50 a scambio cationico fortemente acida e successivamente liofilizzata. Questa Frazione è definita come idrofobica (HoDOM). La Frazione organica ritenuta dalla resina XAD-4 è invece recuperata con acqua:acetonitrile (1:3). L'acetonitrile viene poi rimosso dalla soluzione col rotavapor a 35°C e la soluzione acquosa risultante viene liofilizzata. Questa Frazione è definita come la Frazione idrofila (HiDOM).

Un altro estratto organico ottenuto dallo stesso compost usato in questo lavoro fornito dall'Università di Perugia è il cosiddetto Tè di compost (TEA). La preparazione di questa Frazione è condotta come segue. Il compost è sospeso in acqua deionizzata (1:5 w/v) ed agitato per un periodo di incubazione di dieci giorni a 20°C. Per assicurare condizioni aerobiche, il recipiente per la fermentazione è equipaggiato con un diffusore di aria ed una sonda per l'ossigeno per monitorare costantemente le concentrazioni di ossigeno disciolto che insieme ad un appropriato sistema di controllo guidato da un software provvede a dissolvere concentrazioni di ossigeno 2.0 mg L<sup>-1</sup>. Dopo l'incubazione la sospensione è stata filtrata attraverso carta da filtro in cellulosa e la soluzione risultante conservata a 4°C.

### **3.4 Analisi elementare**

L'analisi elementare dei campioni studiati in questa tesi è stata condotta con un analizzatore Interscience EA1108 CHNS della Fisons Instruments. Pochi milligrammi di ogni campione secco, pesati in una piccola capsula di stagno, sono totalmente



mineralizzati a 1020°C sotto flusso di ossigeno. La CO<sub>2</sub>, l'H<sub>2</sub>O e l'N<sub>2</sub> sviluppati sono separati per gascromatografia e rilevati con un rilevatore a conduttività termica. La determinazione quantitativa di C, H e N è effettuata mediante integrazione dei picchi dei gas sviluppati dalla degradazione delle sostanze organiche usando il software fornito dalla casa costruttrice ed in relazione a curve di calibrazione precedentemente approntate utilizzando come standard l'Acetanilide. La determinazione dell'ossigeno invece è effettuata per differenza per cui può essere sovrastimata.

### **3.5 Procedura di frazionamento analitico**

#### *3.5.1 Estrazione dei composti non legati strutturalmente alla matrice umica.*

Un'aliquota d'ogni campione, dopo essiccazione in stufa per un'ora a 40°C, è sospesa in una soluzione di diclorometano/metanolo (2:1). Per ogni mg di campione vengono utilizzati 0.5 ml di soluzione. La miscela è lasciata in agitazione magnetica per due ore e in seguito centrifugata a 15000 g in tubi di teflon. Il surnatante è recuperato in una beuta di vetro, mentre il residuo solido è risolto in una nuova soluzione di diclorometano/metanolo (2:1) e lasciato in agitazione magnetica per ventiquattro ore. In seguito, dopo aver nuovamente centrifugato a 15000 g, il surnatante è aggiunto a quello ottenuto in precedenza (lipidi liberi), mentre il residuo solido è lasciato essiccare all'aria.

#### *3.5.2 Frazionamento dei composti debolmente legati alla matrice umica.*

Il residuo solido secco dopo estrazione dei lipidi liberi è posto in un tubo di teflon dove viene aggiunta una soluzione al 12% di trifluoruro di boro in metanolo (BF<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 12 % v/v). Per ogni milligrammo di campione iniziale sono aggiunti 0.075 ml di soluzione. Dopo aver flussato azoto ed aver sigillato il tubo, la miscela è

tenuta in stufa a 90°C per 12 ore e, dopo raffreddamento, è centrifugata a 16000 g. Il surnatante è recuperato, mentre il precipitato è sottoposto altre due volte allo stesso trattamento.

Dopo ogni centrifugazione il surnatante viene filtrato su filtri in microfibre di vetro (Watman GF/C). Il materiale depositato sui filtri è recuperato con 5 ml di metanolo che vengono ancora centrifugati. Tutti i surnatanti sono riuniti in una beuta di vetro (estratto transesterificato), mentre il residuo solido è lasciato seccare all'aria.

All'estratto transesterificato è aggiunto un eccesso d'acqua per distruggere il complesso  $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$  residuo, dopodichè sono effettuate quattro estrazioni liquido-liquido con cloroformio in un imbuto separatore. Dalle estrazioni si ottengono due frazioni: la Frazione lipidica in cloroformio e la Frazione acquosa. La Frazione lipidica viene prima deidratata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e poi ridotta in volume per evaporazione al rotavapor.

La Frazione acquosa è, in alcuni casi (che saranno specificati nei risultati), dializzata contro acqua distillata in tubi da dialisi (cut off = 3500 Da), in altri casi sottoposta ad ultrafiltrazione in celle Amicon con filtri da ultracentrifuga Amicon di tipo C (cut off 1000 Da). In entrambi i casi il trattamento è condotto fino ad una conduttività di  $\mu\text{S} = 2$  in acqua risultante dalla dialisi (almeno dopo 48 ore) e dalla ultrafiltrazione. La Frazione acquosa così desalinizzata è poi congelata e liofilizzata.

### *3.5.3 Frazionamento dei composti fortemente legati alla matrice unica.*

Il residuo solido secco derivante dalla transesterificazione è sottoposto ad idrolisi alcalina in KOH 1M in  $\text{CH}_3\text{OH}$  per 2 ore a 70°C, in un pallone con riflusso a ricadere ed agitazione magnetica. Sono utilizzati 0.25 ml di soluzione per ogni milligrammo di materiale iniziale. Dopo raffreddamento, la sospensione è centrifugata a

5000 g per 15 minuti in tubi di vetro. Il supernatante è raccolto in una beuta mentre sul precipitato vengono effettuate due ulteriori estrazioni con 10 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$  e due con 10 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  applicando un'agitazione meccanica per 15 minuti. Dopo ogni estrazione la sospensione è centrifugata a 5000 g per 15 minuti. Tutti i supernatanti vengono riuniti nella stessa beuta (estratto dopo idrolisi alcalina) mentre il residuo solido è lasciato seccare all'aria.

Al supernatante dopo idrolisi alcalina è aggiunta una quantità uguale d'acqua, dopodiché l'estratto è acidificato a  $\text{pH}=2$ . In seguito, vengono effettuate tre estrazioni liquido-liquido con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  in imbuto separatore. La Frazione acquosa e la Frazione organica ottenute dall'estrazione liquido-liquido dopo idrolisi alcalina sono trattate come già descritto per le frazioni estratte dopo transesterificazione.

Il residuo solido dopo essere stato estesamente dializzato contro acqua distillata viene sospeso in 20 ml di una soluzione acquosa di HI al 47%. La miscela è sottoposta per 48 ore ad agitazione magnetica a  $70\text{-}80^\circ\text{C}$ , in un pallone di vetro chiuso con tappo a smeriglio dopo aver saturato con azoto. Lo iodio formato durante la reazione viene eliminato mediante aggiunta di tiosolfato di sodio dopo che il pH è stato portato alla neutralità con  $\text{NaHCO}_3$ . Il surnatante rimane incolore quando tutto lo iodio ha reagito con il tiosolfato. Poi si centrifuga in tubi di vetro a 5000 g per dividere il surnatante dal precipitato. Il residuo solido viene estesamente dializzato contro acqua distillata e liofilizzato.

#### *35.4 Frazionamento con SPE*

Gli estratti organici provenienti dai tre passaggi di frazionamento sequenziale sono prima portati a secco col rotavapor e poi ripresi in 10 mL di una soluzione di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /isopropanolo (2:1 v/v). Un mL di ciascuna Frazione viene caricato su una

colonnina per estrazione in fase solida (SPE) con fase stazionaria legata ad amminopropile (Phenomenex Strata NH<sub>2</sub> 500 mg, 3 ml)), precedentemente condizionata con 4 ml di n-esano. La colonnina è poi eluita con 8 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/isopropanolo (2:1 v/v), per ottenere la Frazione neutra, e successivamente con 8 ml di una soluzione al 2% di acido acetico in etere etilico, per ottenere la Frazione acida (Bull *et al.*,2000). La capacità di ritenzione delle cartucce SPE, controllata utilizzando come standard il sitosterolo e l'acido docosandioico è maggiore del 95% (Spaccini e Piccolo, 2006).

### **3.6 Analisi gas cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS)**

#### *3.6.1 Derivatizzazione*

Le frazioni acida e neutra ottenute dagli estratti organici del frazionamento sequenziale sono derivatizzate prima di essere analizzate per GC/MS. Ciascuna Frazione viene prima portata a secco al rotavapor, e, dopo l'aggiunta di una quantità nota di acido tridecanoico come standard interno, metilata in 5 ml di CH<sub>3</sub>OH addizionato con 0.5 mL di cloruro di acetile e lasciata per 30 minuti a 60°C con riflusso a ricadere. Dopo metilazione, le frazioni sono portate a secco sotto un leggero flusso di azoto e poi sililate con 100 µl di BSTFA (N, O-bis (trimetilsilil fluoroacetammide)) contenenti 1% TMCS (trimetilclorosilano) fornito dalla Suprachrom s.r.l, per un'ora a 70°C . Il volume è portato a 400 µl con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e la soluzione sottoposta GC/MS.

Poichè alcune classi di composti sono risultate sottostimate con l'uso dell'acido tridecanoico come unico standard interno, l'analisi quantitativa è stata effettuata usando curve di calibrazione ottenute con i seguenti standard esterni: acido  $\alpha,\omega$ -docosandioico

(85%), acido  $\omega$ -idrossiesadecanoico (98%), acido tridecanoico (98%) e  $\beta$ -sitosterolo (40%) (Fiorentino *et al*, 2006).

### 3.6.2 Gas cromatografia-spettrometria di massa

Le analisi GC/MS sono effettuate con un cromatografo PerkinElmer Autosystem XL accoppiato ad uno spettrometro di massa PerkinElmer Turbomass Gold. L'iniettore è tenuto a temperatura costante di 250°C. È stata usata una colonna capillare di silice fusa (Restek Rtx<sup>®</sup>-5MS, 30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25  $\mu$ m spessore del film) sotto un flusso di elio di 1.6 ml/min. La temperatura del forno è stata programmata da 100°C a 300°C, con un incremento di 4°C/m, e tenuto per 20 minuti a 300°C. Lo spettrometro di massa è stato adoperato in modalità di scansione completa nell'intervallo 50-600 m/z con un'energia di ionizzazione ad impatto elettronico di 70 eV. L'identificazione dei composti è effettuata confrontando lo spettro di massa di ciascun picco cromatografico a quelli riportati nella libreria NIST- MS.

### 3.6.3 Pirolisi e termochemolisi “in-linea”

Le pirolisi classiche e le termochemolisi con idrossido di tetrametilammonio e con idrossido di tetraetilammonio sono state eseguite “in linea” alla GC-MS per mezzo di un pirolizzatore Pyrojector II della SGE connesso al gas cromatografo. Circa 1 mg di campione secco viene posto in un capillare di quarzo e bagnato con 10  $\mu$ l di idrossido di tetrametilammonio (25% w/w in metanolo) o di tetraetilammonio (35% w/w in acqua) e lasciato seccare per 24 h. Il capillare viene inserito nella sonda campionatore per solidi per mezzo di un uncino flessibile e, così, nella testa dell'iniettore. La pirolisi è effettuata a 600°C sotto elio come gas di trasporto. Durante la successiva separazione gas-cromatografica dei prodotti di pirolisi, la temperatura del forno è fissata inizialmente a 50° C, e poi incrementata di 7°C al minuto fino a 300°C e tenuta a

questa temperatura per 10 minuti. Tutte le analisi di termochemolisi sono state condotte in triplicato. L'abbondanza relativa (%) di ogni composto è calcolata come il rapporto tra l'area di ogni singolo picco e l'area totale di tutti i picchi identificati nel cromatogramma ionico totale (TIC).

### **3.7 $^{13}\text{C}$ CPMAS NMR**

Gli spettri NMR delle sostanze umiche e da compost sono stati acquisiti con la tecnica  $^{13}\text{C}$  CPMAS (Cross Polarisation Magic Angle Spinning  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) con un apparecchio Bruker AV300 operante sul  $^{13}\text{C}$  a 75.475 MHz. La velocità di rotazione del rotore è stata di 13000 Hz, il tempo di riciclo di 1 s ed il tempo di acquisizione di 20 ms. Tutti gli esperimenti sono stati condotti con una sequenza di impulsi CP con RAMP. Gli spettri sono stati processati usando il software Mestre-C versione 4.3.6.0. Tutti le curve di decadimento esponenziale (FID) sono state trasformate utilizzando prima un 16 k zero filling e poi una funzione esponenziale filtro con line Broadening (LB) di 100HZ.

### **3.8 Spettrometria di massa con interfaccia ad elettrospray (ESI-MS)**

Gli spettri di massa sono stati ottenuti usando uno spettrometro ThermoFinnigan TSQ Quantum AM con triplo quadrupolo, equipaggiato con una sorgente ESI. Un sistema HPLC ThermoFinnigan surveyor è stato interfacciato allo spettrometro di massa per le analisi LC-MS e LC-MS/MS. Le migliori condizioni ESI-MS sono risultate essere: voltaggio di ionizzazione 5kV; temperatura del capillare di trasferimento 200°C; volume di iniezione di 20  $\mu\text{l}$ . Il cone voltage invece è stato variato a seconda degli esperimenti e sarà discusso nel capitolo 9 così come i solventi utilizzati. L'azoto è stato

utilizzato sia come gas essiccante sia di nebulizzazione. Lo spettrometro di massa è stato utilizzato in modalità di scansione completa nell'intervallo di massa da 220 a 1500 amu, con un tempo di scansione di 1 s in modalità "centroid". Il numero medio ( $M_n$ ) e il peso medio ( $M_w$ ) sono stati calcolati mediante la somma pesata delle intensità relative dei valori  $m/z$  ottenuti dagli spettri e sottratti del rumore di fondo, assumendo che gli ioni avessero una singola carica sull'intero intervallo scansionato (Piccolo e Spiteller, 2003).

La separazione HPSEC in linea alla ESI-MS è stata eseguita con una colonna HPSEC analitica Phenomenex GPC3000 (3600 mm x 21.2mm d.i.) preceduta da una precolonna Biosep SEC-S-2000 (78.00 mm x 21.2 mm d.i.). Una soluzione 9:1 di ammoniacca 0.05%/acetonitrile è stato usato come eluente ad un flusso di 0.5 ml.min<sup>-1</sup>. Gli esperimenti MS-MS sono stati eseguiti utilizzando argon come gas inerte nella camera di collisione ad una pressione nominale di 1.5 mTorr. I prodotti di collisione degli ioni scelti sono stati monitorati a tre diversi livelli di energia: 20 eV, 30 eV e 40eV.

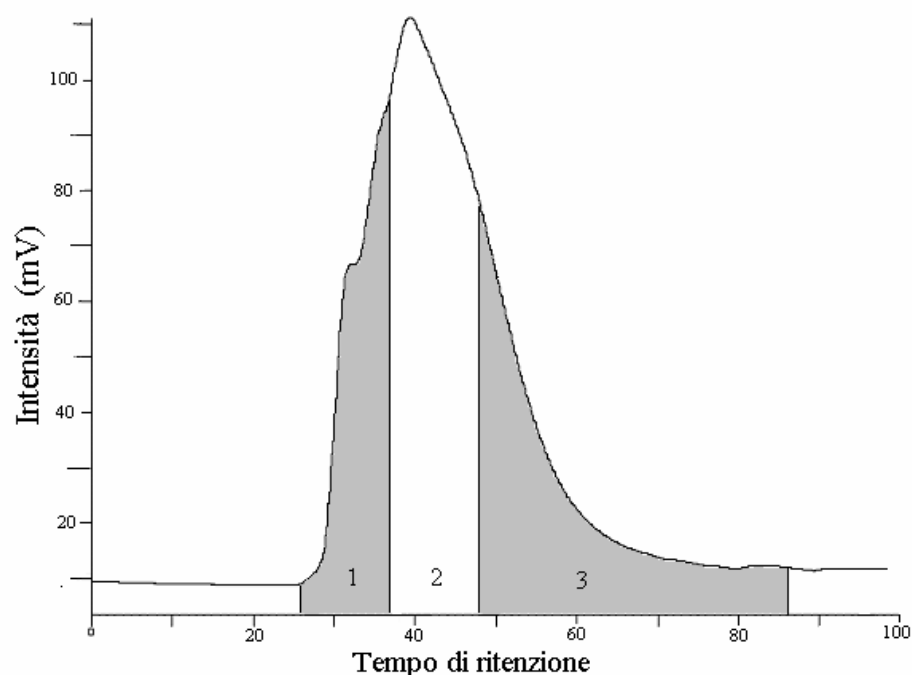
## **Capitolo 4**

### **Caratteristiche generali dei campioni umici**

#### **4.1 Cromatografia ad esclusione molecolare ad alta pressione**

La cromatografia ad esclusione molecolare ad alta pressione in modalità preparativa è una tecnica utilizzata per ottenere frazioni dimensionali di sostanze umiche di minore eterogeneità (Piccolo e al., 2002). La tecnica HPSEC non è utilizzata in

questa tesi per per separare l'HA di partenza in frazioni a dimensione molecolare diversa . In Figura 4.1 è riportato il cromatogramma HPSEC dell'HA iniziale dove sono evidenziati gli intervalli temporali a cui sono state raccolte le frazioni durante l'eluizione. Negli intervalli 26-38 min, 38-50 min, e 50-98 min, sono state raccolte, rispettivamente, le frazioni 1, 2, e 3, a dimensioni molecolari pregressivamente inferiori. Da 1 mg di HA sono stati recuperati rispettivamente 0.295 mg di Frazione 1, 0.310 mg di Frazione 2, e 0.353 mg della Frazione 3, con una perdita totale di materiale iniziale del 4%.



**Figura 4.1** Cromatogramma HPSEC dell'HA registrato con un rivelatore UV a 280 nm



## 4.2 Analisi elementare

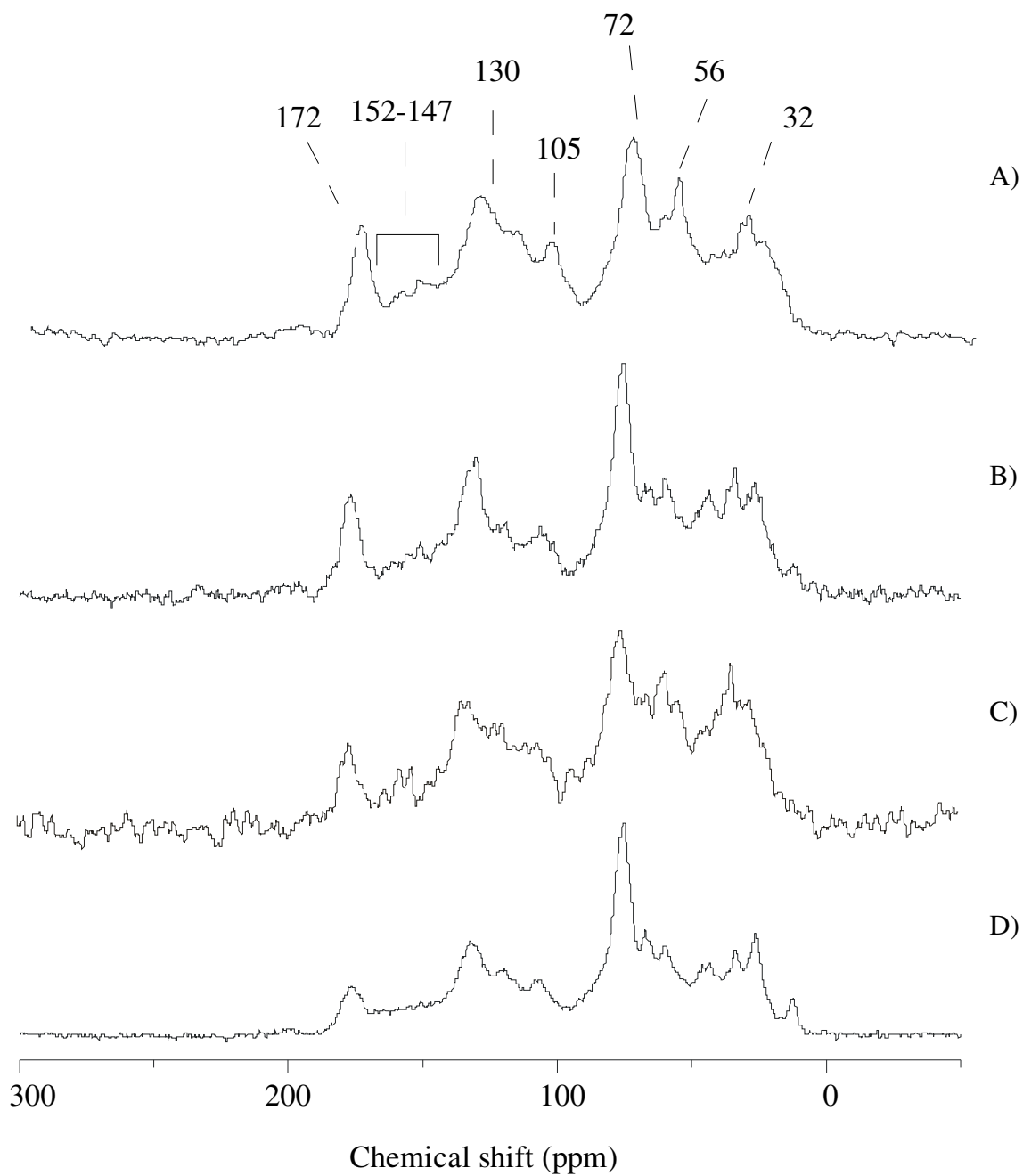
La Tabella 4.1 mostra la composizione elementare dei campioni umici ed i relativi rapporti atomici. Il rapporto H/C dà indicazioni sul grado di condensazione e di insaturazione delle sostanze umiche (Belzile e al., 1997). Questo rapporto è più basso nell'HA che nelle frazioni HPSEC, indicando perciò un maggiore grado di condensazione e insaturazione nel campione umico non frazionato. Tra le frazioni HPSEC, la Frazione 1 e la Frazione 2 hanno un valore simile di H/C, mentre la Frazione 3 ha un valore molto più basso. Anche i rapporti N/C incrementano con l'aumentare delle dimensioni molecolari apparenti. I rapporti O/C, invece, non indicano una relazione diretta tra il contenuto di ossigeno e le dimensioni delle frazioni, infatti questo rapporto è nell'ordine: Frazione 3 > Frazione 1 > Frazione 2.

**Tabella 4. 1** Composizione elementare (%) dei campioni umici.

<i>Campioni</i>	C	N	H	O	C/N	H/C	O/C
HA	39.48	2.26	3.13	55.13	20.38	0.95	1.05
Frazione 1	26.07	1.81	2.57	69.55	16.08	1.18	2
Frazione 2	34.33	2.14	3.39	60.13	18.72	1.18	1.31
Frazione 3	21.51	1.17	2.49	74.83	21.45	1.39	2.61

## 4.3 <sup>13</sup>C CPMAS NMR

Le informazioni spettrali ottenuti dagli spettri <sup>13</sup>C CPMAS-NMR (Fig. 4.1) dell'HA e delle sue frazioni sono riassunte in Tabella 4.2. Il segnale nell'intervallo 0-50 ppm è attribuito ai carboni alchilici, come i carboni metilenici (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- ed i gruppi metili terminali CH<sub>3</sub> dei lipidi lineari di origine vegetale, come le cere e i biopoliesteri. La



**Figura 4.2** Spettri CPMAS-<sup>13</sup>C-NMR di: HA (A), Frazione 1 (B), Frazione 2 (C), Frazione 3 (D).

presenza del picco a 40 ppm può indicare anche gruppi alchilici ramificati. Il segnale nell'intervallo 50-70 ppm è invece assegnato ai carboni alifatici del tipo C-N come negli amminoacidi o peptidi. La risonanza nell'intervallo 71-110 ppm origina dai carboni C-O come negli alcoli e nei carboidrati. L'intenso segnale intorno ai 72 ppm corrisponde alla sovrapposizione delle risonanze dei carboni C2, C3 e C4 nei monomeri della cellulosa e dell'emicellulosa, mentre il segnale a 106 ppm, 65 ppm e le spalle a 82-85 ppm sono assegnati, rispettivamente, al carbonio anomerico C1 ed ai carboni C6 e C4 (Atalla e al., 1999). La risonanza nell'intervallo 110-167 ppm è assegnata invece ai carboni aromatici dei carboidrati. I picchi relativamente minori attorno 147 e 152, visibili particolarmente negli spettri dell'HA e della Frazione 2, sono assegnati ai carboni aromatici sostituiti con i gruppi OH e OCH<sub>3</sub> del guaiacolo e del siringolo. La risonanza tra 167 e 192 ppm è assegnata ai gruppi carbossilici inclusi i sali, gli acidi liberi, e gli esteri. La risonanza nell'intervallo 192-230 ppm è infine attribuita al carbonio carbonilico C=O in aldeidi e ai chetoni.

**Tabella 4.2** Distribuzione di carbonio (%) nelle regioni spettrali degli spettri CPMAS-<sup>13</sup>C-NMR dei campioni umici.

<i>Campioni</i>	0-50	50-71	71-110	110-160	160-190	190-230	HI/HB <sup>a</sup>
HA	21	16	20.6	29.3	11.7	1.4	0,99
Frazione 1	25.8	16.0	23.6	24.5	9.2	0.14	0,96
Frazione 2	35	16	24.8	24.0	9.4	0.03	1.01
Frazione 3	30	13	29.5	24.3	7.6	0.38	1.02

a. Rapporto carboni idrofilici/carboni idrofobici = [(50-110)+(160-230)]/[(0-50)+(100-160)]

Come già osservato dall'analisi elementare, le frazioni HPSEC risultano meno aromatiche rispetto all'HA mentre si ha un aumento nel contenuto di gruppi polari. In particolare si osserva un aumento del segnale dei carboidrati al diminuire delle dimensioni molecolari. La distribuzione del carbonio nei differenti intervalli è usato per definire il rapporto HI/HB, un indice di idrofilicità del complesso materiale organico. Questo rapporto indica che la Frazione 3 è la più idrofila seguita dalla Frazione 2 e dalla Frazione 1. Infine il contenuto di gruppi C-N aumenta con il peso molecolare nominale delle frazioni in accordo con l'aumento dell'azoto verificato con l'analisi elementare.

#### **4.4 Frazionamento chimico sequenziale.**

In Tabella 4.3 è riportato il peso dei residui solidi dei campioni unici ottenuti dopo l'estrazione della componente libera (CL), della componente debolmente e fortemente legata (D) alla matrice unica (liberata per transesterificazione e per idrolisi alcalina in metanolo). Per l'HA) è riportato anche il peso del residuo solido dopo trattamento con HI (RHI). È evidente che per le tre frazioni vi è una perdita in peso superiore rispetto all'HA per ogni tappa del frazionamento. Tale perdita giustifica anche la maggiore quantità di composti organici identificati nelle frazioni HPSEC (Tabella 4.4). Infatti si può notare che otteniamo una quantità maggiore di composti organici quando il frazionamento analitico è eseguito sulle frazioni separate mediante HPSEC, rispetto a quando il frazionamento è eseguito sull' HA non separato.

**Tabella 4.3** Peso del materiale di partenza e dei residui solidi ottenuto dopo i vari passaggi del frazionamento analitico sequenziale.

	<b>CL<sup>a</sup></b>	<b>D<sup>b</sup></b>	<b>RHI<sup>c</sup></b>
HA	76.73(±10)	69.02(±19)	34.16(±12)
Frazione 1	47.47 (±7)	23.42(±8)	0.0
Frazione 2	59.36 (±8)	22.19(±6)	0.0
Frazione 3	63.54 (±10)	21.47(±6)	0.0

a. CL = Residuo dopo estrazione della componente libera

b. D = Residuo dopo transesterificazione e metanolisi

c. RHI = Residuo dopo trattamento con acido iodidrico

Infatti, considerando che da 100 mg di HA otteniamo 29.5 mg, 31.0 mg e 35.3 mg rispettivamente di Frazione 1, Frazione 2 e Frazione 3, e considerando le concentrazioni dei composti organo-solubili riportate in Tabella 4.4, otteniamo per la componente libera 2.438 mg estratti complessivamente dalle tre frazioni HPSEC a partire da 100 mg di HA iniziale, contro i 0.67 mg da 100 mg di HA non separato. Per la Frazione organica dopo transesterificazione otteniamo 1.598 mg dalle frazioni HPSEC contro 0.621 mg dall'HA, per la Frazione organica dopo metanolisi 0.133 mg contro 0.09 mg. Per quanto riguarda le frazioni acquose abbiamo invece una leggera perdita dopo il frazionamento, infatti, da 100 mg di HA dopo separazione HPSEC otteniamo 5.8 mg di Frazione acquosa dalla transesterificazione, contro 7.5 mg da 100 mg di HA non separato. Dopo metanolisi otteniamo invece 0.37 mg di fase acquosa dalle frazioni HPSEC contro 0.5 mg dall'HA. In conclusione otteniamo che le estrazioni e le reazioni idrolitiche hanno rese maggiori per le frazioni HPSEC rispetto all'HA. Inoltre i prodotti ottenuti dalle frazioni HPSEC sono maggiormente distribuiti nella fase liposolubile che nella fase acquosa.

**Tabella 4.4** Resa totale (mg/g) dei prodotti ottenuti nelle frazioni organiche<sup>a</sup> ed acquose<sup>b</sup> dai tre passaggi del frazionamento sequenziale che hanno liberato le componenti libere (CL), le debolmente legate (DL), e le fortemente legate (FL) alla matrice umica.

	CL	DL		FL	
	<i>Organica</i>	<i>Organica</i>	<i>Acquosa</i>	<i>Organica</i>	<i>Acquosa</i>
HA	6.72	6.21	75	0.9	0.5
Frazione 1	28.47	9.34	14	0.71	0.6
Frazione 2	26.70	30.45	150	1.33	0.4
Frazione 3	22.26	10.77	20.5	2.01	0.2

- a. Somma delle quantità (mg) dei composti identificati mediante GC/MS normalizzata per grammo di materiale di partenza.  
b. Peso delle frazioni acquose dopo liofilizzazione, normalizzato per grammo di materiale di partenza.

## CAPITOLO 5

### ANALISI GC/MS DEI PRODOTTI ORGANO-SOLUBILI OTTENUTI DAL FRAZIONAMENTO SEQUENZIALE DEI CAMPIONI UMICI

#### 5.1 Introduzione

In letteratura (Hayes e Swift, 1978, 1990; Stevenson, 1989), sono descritte delle procedure di reazioni degradative ossidanti e riducenti utilizzate per determinare le componenti molecolari delle sostanze umiche. Tra queste, la degradazione con l'amalgama di sodio ha dato le informazioni più utili, benché vi siano stati riconosciuti

diversi artefatti. I principali composti identificati sono stati i fenoli ed i loro derivati. Anche diverse tecniche di distillazione e di fusione su zinco (Cheshire e al., 1967, 1968; Hansen e Schnitzer, 1969a, 1969b) sono state descritte per lo studio delle HS. Queste hanno prodotto strutture poliaromatiche, ma con basse rese (<1%) e molti artefatti.

L'ossidazione con permanganato è stata spesso applicata (Wright e Schnitzer, 1959b; Schnitzer e Wright, 1960a; Hansen e Schnitzer, 1966; Ishiwatari e al., 1983), ma i prodotti ottenuti sono per lo più artefatti da cui è molto difficile risalire ai prodotti originali. L'ossidazione con ossido di rame, è una ossidazione relativamente più blanda ed è utilizzata per caratterizzare le lignine (Wallis, 1971; Hedges e Ertel, 1982). Applicata alle HS, ha prodotto una grande varietà di acidi metossibenzoici e fenolici e di composti alifatici.

Contrariamente alle reazioni degradative forti, informazioni più precise sulla reale composizione delle HS sono ottenibili da un processo di rimozione selettiva delle componenti umiche basato su una serie di estrazioni e blande reazioni idrolitiche che separino le componenti molecolari progressivamente più fortemente legate alla matrice umica.

La transesterificazione con trifluoruro di boro in metanolo ( $\text{BF}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ ) è stata utilizzata con successo nello studio strutturale delle cutine e delle suberine delle piante (Kolattukudy, 1993) ed degli acidi umici e delle umine (Almendros e Sanz, 1991, 1992; Fiorentino e al., 2005). La tecnica si basa su una reazione degradativa blanda che specificatamente scinde i legami esterei sostituendo un metile al radicale alcossi uscente. I prodotti ottenuti con questa tecnica consistono in una varietà di acidi grassi lineari e ramificati, di diacidi a lunga catena, di di- e tri- idrossiacidi e di un gran numero di composti aromatici (Almendros e Sanz, 1991; Fiorentino e al., 2005).

Un'altra tecnica idrolitica ampiamente utilizzata nello studio delle HS è l'idrolisi basica catalizzata da KOH in metanolo (Lopes e al., 2000; Shi e al., 2001; Naafs e van Bergen, 2002). Costituisce una tecnica idrolitica non distruttiva, più forte della transesterificazione acida, che permette di identificare, dopo rottura di altri legami esterei, composti più strettamente associati alla matrice umica di quelli liberati per transesterificazione. Naafs e van Bergen (2002) hanno evidenziato che le rese di estrazione in solventi organici dopo l'idrolisi basica, sia in termini qualitativi che quantitativi, dipendono dal valore di pH al quale viene effettuata l'estrazione.

Infine il trattamento con una soluzione acquosa di HI, reagente usato tradizionalmente per la rottura di legami eteri (Staude e Patat, 1967) e glicosidici, è stato impiegato per rimuovere carboidrati dalle matrici umiche (Almendros e al., 1998; Bayer e al., 1984).

L'utilizzo in sequenza di tecniche idrolitiche progressivamente più forti consente di ottenere, oltre a informazioni sulla composizione molecolare delle sostanze umiche, anche sull'organizzazione gerarchica delle differenti unità di queste sostanze (Almendros e al., 1998). In questo lavoro di tesi abbiamo così utilizzato per la caratterizzazione dell'HA e delle frazioni HPSEC, una serie di estrazioni e di reazioni idrolitiche in sequenza che prevedono prima la rimozione mediante solventi organici della componente libera, estraibile senza trattamenti chimici, poi della componente legata debolmente per mezzo della transesterificazione col complesso trifluoruro di boro – metanolo, poi la componente associata alla matrice umica con legami più forti mediante metanolisi alcalina ed infine la rimozione dei carboidrati mediante trattamento con HI.



In questo capitolo riportiamo la caratterizzazione molecolare per GC-MS delle frazioni organiche isolate dall'HA e dalle sue frazioni separate per HPSEC durante il frazionamento sequenziale.

## **5.2. Componente libera**

La componente libera è costituita dalle molecole non legate strutturalmente alla matrice umica, ma associate ad essa per mezzo di deboli interazioni chimico-fisiche. Esse possono essere rimosse dalla matrice umica mediante solventi organici senza trattamenti chimici del campione. La Tabella 5.1 mostra le classi di composti identificati come componenti non legate strutturalmente, sia nell'HA sia nelle sue tre frazioni. Sono altresì riportati in tabelle le rese di estrazione, gli intervalli dimensionali e gli omologhi dominanti.

Le più importanti classi di molecole sono nell'ordine: acidi grassi, n-alcanoli, alcani, carboidrati e minori quantità di composti aromatici, steroli e terpeni. Queste composti sono presenti in tutti i campioni umici ma vi hanno una diversa distribuzione relativa. Un risultato sorprendente è che le rese d'estrazione sono significativamente maggiori per le frazioni HPSEC che per l'HA (Tabella 5.1). Sebbene dopo la separazione per HPSEC vi sia una perdita della componente aromatica, come mostrato dall'analisi NMR, che va dal 22% al 38% a seconda della Frazione, non si possono tuttavia giustificare le maggiori rese ottenute dalle

**Tabella 5.1** Rese ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso secco) e composizione<sup>a</sup> delle componenti libere negli estratti organici dai campioni umici.

Classi di composti	HA	Frazione 1	Frazione 2	Frazione 3
Acidi <i>n</i> - alcanoiciinsaturi (%) lunga catena(%)	3440(C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>28</sub> 4.0 6.2	19970(C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>28</sub> 0.9 1.3	16780(C <sub>16</sub> ,C <sub>8</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>28</sub> 9.8 4.1	14020(C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>28</sub> 4.13 1.14
Alcoli	1270 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	2030 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	4230 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	4250 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>
Alcani	310	3170	1530	3820
Carboidrati	720	430	320	170
Composti aromatici	600	2570	3070	-
Steroidi	230	-	310	-
Diterpenoidi	150	300	460	-

a. Intervallo da Ci a Cj; in parentesi gli omologhi dominanti

frazioni HPSEC, anche dieci volte superiore, con un mero bilancio aritmetico. Piuttosto, la separazione delle frazioni per dimensioni molecolari durante l'eluizione per HPSEC deve aver diminuito, rispetto all'HA, la forza di associazione intermolecolare e la stabilità conformazionale, rendendo più facilmente estraibili una quantità maggiore di composti non legati strutturalmente alla matrice umica. Questo risultato è compatibile con la considerazione che le sostanze umiche sono costituite da molecole relativamente piccole (<1000 Da) tenute insieme da legami deboli (Piccolo, 2001, 2002). Infatti le molecole umiche non legate covalentemente alla matrice umica non sono estraibili dall'HA perchè intrappolate in domini eterogeni strettamente auto-associati per interazioni deboli multiple (legami idrofobici e di idrogeno). I cambiamenti

conformazionali ed il riarrangiamento delle auto-asociazioni molecolari intervenuti durante la separazione HPSEC possono aver reso le interazioni intemolecolari meno importanti e facilitato il rilascio delle componenti libere dalle frazioni separate

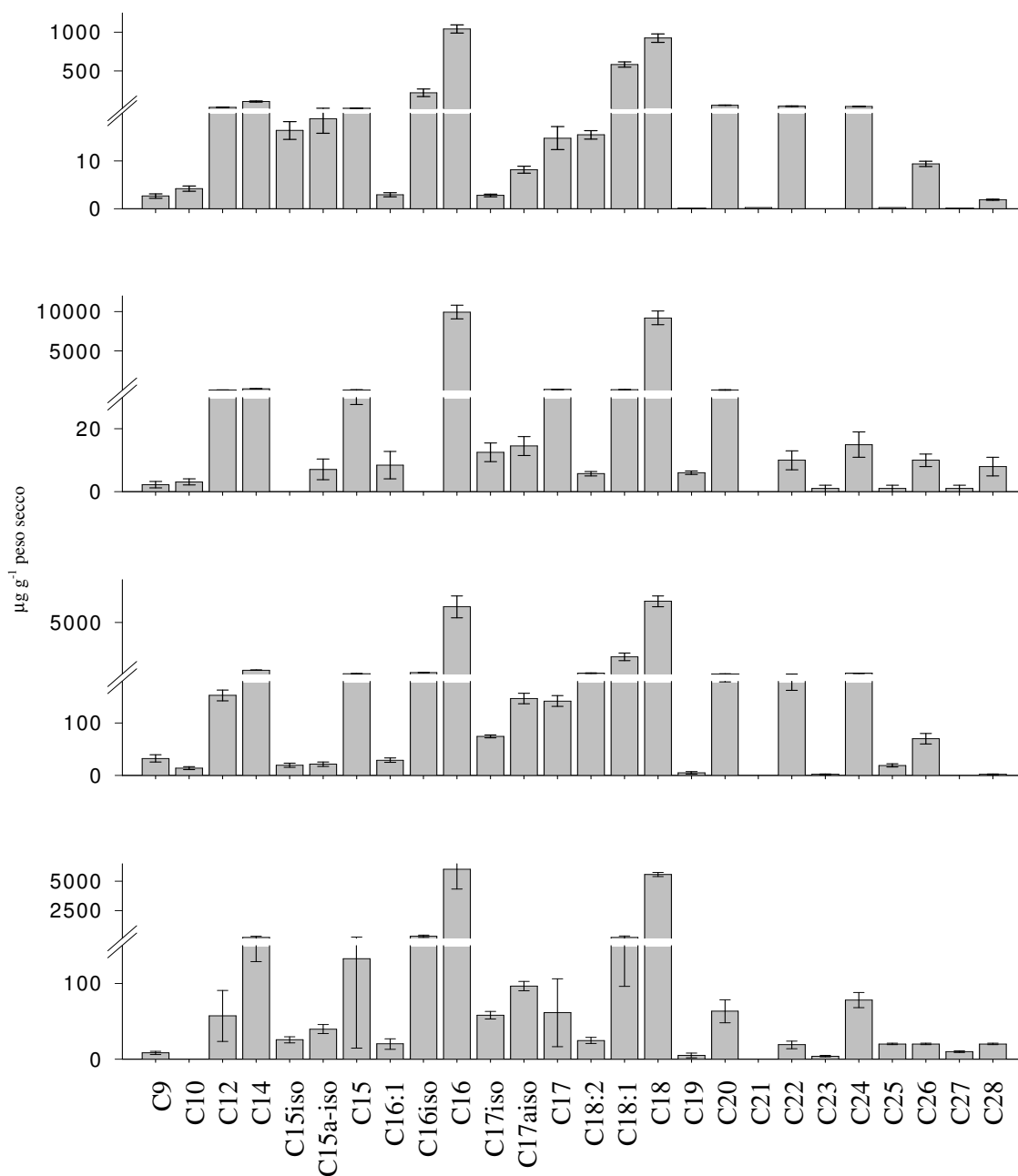
#### *5.2.1 Acidi alifatici.*

Gli acidi alifatici costituiscono la classe di composti più abbondante presente negli estratti organici di ciascun campione unico. In Figura 5.1 sono riportate le distribuzioni degli acidi grassi strutturalmente non legati per i campioni unici studiati. Le concentrazioni riportate sono la somma delle quantità ritrovate nelle frazioni acide e nelle frazioni neutre (Cap.3, par.3.5.4), i cui cromatogrammi sono invece riportati nelle figure 5.25-33

Nell'HA, la serie di omologhi degli acidi grassi spazia dal C<sub>9</sub> al C<sub>28</sub>, essendo i C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub> i membri più abbondanti, con un contributo minore da parte degli acidi grassi insaturi (C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub> and C<sub>18:2</sub>). La preferenza delle molecole a numero pari di carbonio per le molecole a lunga catena (>C<sub>18</sub>) suggerisce un input dalle piante superiori maggiormente derivante dalla suberina (Kolattukudy, 1980a; Walton, 1990; Ryser and Holloway, 1985; Matzke and Rieder, 1991; Bull et al., 2000b), mentre i composti a catena corta mostrano una distribuzione simile agli acidi grassi derivanti dalla cutina. Anche gli acidi grassi insaturi sono componenti importanti dei vegetali, la loro bassa concentrazione rispetto a quella del C<sub>18</sub> saturo può essere imputata ad una ossidazione del doppio legame dovuta a degradazione batterica (Fiorentino e al., 2005).

Tuttavia i biopoliesteri non sono l'unica fonte di acidi grassi. Anche composti a catena lineare di origine fungina possono essere una fonte di acidi alcanici (Lichtfouse

et al., 1995) e un contributo dall'ossidazione degli *n*-alcani o *n*-alcanoli non può essere esclusa (Amblès et al., 1994a).



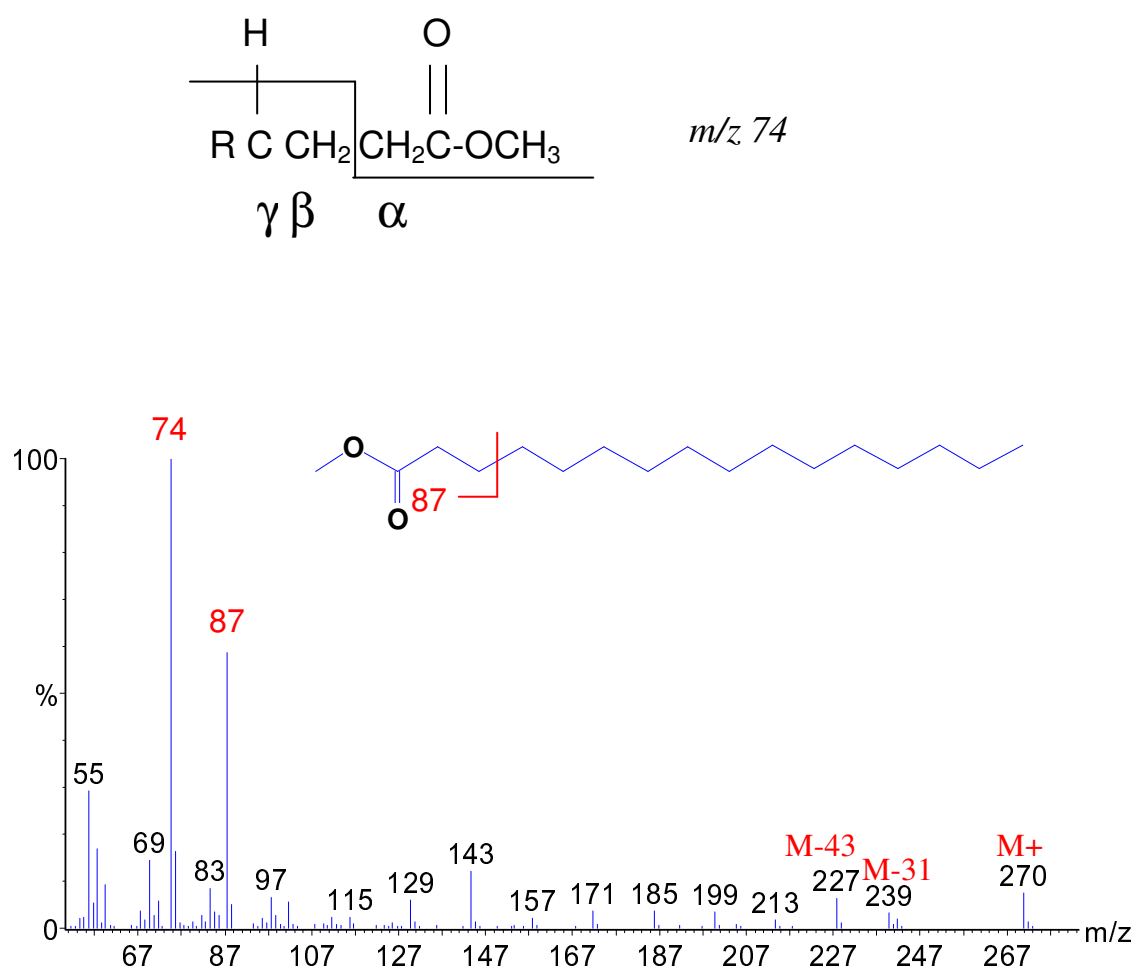
**Figura 5.1:** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$  peso secco) e distribuzione degli acidi grassi analizzati negli estratti organici dei campioni umici: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3.

Inoltre tra gli acidi grassi sono osservabili anche gli acidi *iso*- ed *anteiso*- alcanoidi ramificati con 15 e 17 atomi di carbonio (Figura 5.1), che sono costituenti d'origine microbica comunemente ritrovati nella sostanza organica naturale.

Nella Figura 5.1 è evidente che la concentrazione degli omologhi a catena corta è molto più alta rispetto a quella degli omologhi a catena lunga. Questo risultato è probabilmente attribuibile alla filtrazione prima dell'HPSEC che ha parzialmente rimosso gli omologhi a più alto numero di carbonio. La Frazione 2 presenta una serie omologa degli acidi grassi con una distribuzione simile a quella dell'HA, mentre le frazioni 1 e 3 presentano un minore grado di insaturazione. Sebbene la distribuzioni di classi molecolari sia simile, le rese relative sono differenti tra i diversi materiali umici. Dalla Frazione 1 è estratta una maggiore quantità di acidi grassi, seguita dalla Frazione 2 e dalla Frazione 3, mentre dall'HA è estratto una quantità molto più esigua. Nelle frazioni 1 e 3, gli omologhi a sedici e a diciotto atomi di carbonio rappresentano una porzione molto importante, raggiungendo, rispettivamente, il 96% e l'89% del totale, e riflettono una maggiore omogeneità di queste frazioni rispetto alla Frazione 2 e all'HA, dove esse rappresentano percentuali minori (62% e 74%) .

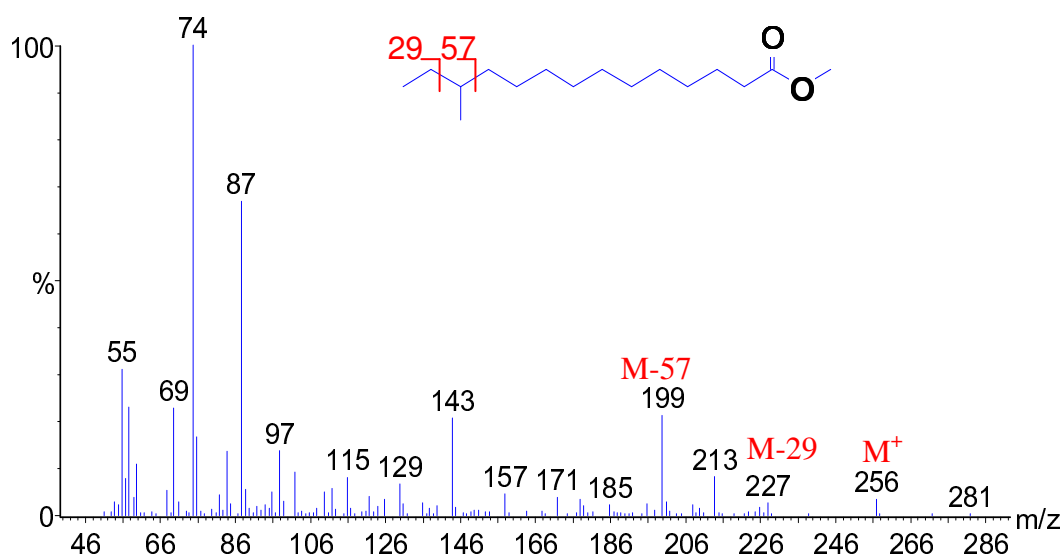
Gli acidi grassi sono identificati per spettrometria di massa sia come metilesteri che come trimetilsililesteri, in relazione, rispettivamente, ai prodotti delle due derivatizzazioni eseguite sugli estratti organici prima dell'analisi GC/MS (Cap.2, par. 3.6.1). Tuttavia i derivati metilati sono prevalenti rispetto a quelli trisililati. Nelle figure seguenti vengono riportati gli spettri di massa degli acidi saturi metilati rispettivamente a 16 atomi di carbonio lineare e a 15 atomi di carbonio ramificato in posizione *anteiso*.

Il picco molto intenso a  $m/z$  74 è caratteristico dei monoesteri e deriva dal riarrangiamento di McLafferty, risultante dalla rottura del legame in posizione  $\beta$  al carbonio carbossilico e dal trasferimento dell'idrogeno  $\gamma$ . Altro picco caratteristico dei metilesteri è  $m/z$  87 che risulta dalla rottura in  $\gamma$ . Il picco a  $m/z$   $[M-31]^+$  è dovuto alla perdita del radicale  $CH_3O\cdot$ , mentre lo ione  $m/z$   $[M-43]^+$  deriva dalla perdita di un  $C_3$  (carbonio da 2 a 4) mediante un complesso riarrangiamento (Mollova e Longevialle, 1990; Vidavsky e al., 1994).



**Figura 5.2:** Spettro di massa dell'acido esadecanoico metil estere

Confrontati con gli spettri dei composti lineari corrispondenti, le intensità relative dei picchi a  $[M-29]^+$  e  $[M-57]^+$ , insieme ai tempi di ritenzione, permettono di caratterizzare i composti *iso* ed *anteiso* (Figura 5.3).

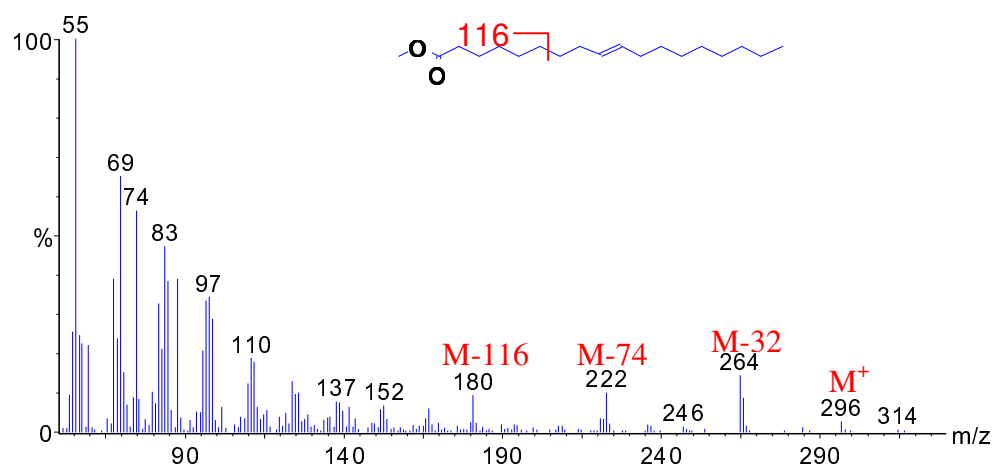


**Figura 5 3** :Spettro di massa dell'acido *anteiso*-pentadecanoico metil estere

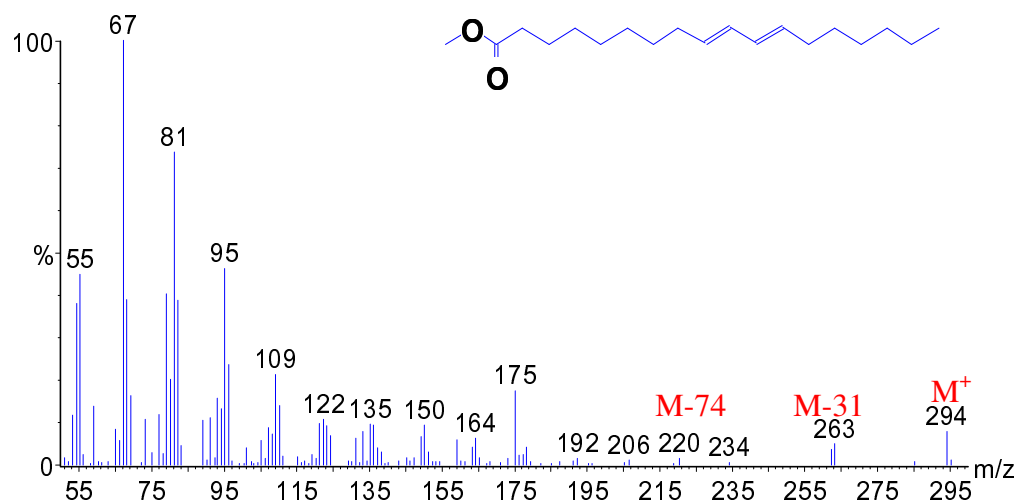
In Figura 5.4 viene riportato lo spettro di massa dell'acido oleico metil estere. Lo ione molecolare ( $m/z$  296) è chiaramente visibile, e gli ioni indicanti perdita di metanolo ( $m/z$  264) e perdita dello ione di McLafferty ( $m/z$  222) sono abbondanti, così come lo ione di McLafferty stesso ( $m/z$  74). Uno ione caratteristico a  $[M-116]$  ( $m/z$  180, in questo caso), insieme con ioni omologhi a  $m/z$  166, 152, etc., sono anche diagnostici. Il primo di questi ioni si forma dalla perdita di un frammento contenente il gruppo carbossilico per rottura tra i carboni 5 e 6, con l'aggiunta di un atomo di idrogeno. Così, diversamente dagli spettri degli acidi grassi saturi metil esteri, gli spettri degli acidi monoinsaturi sono dominati dagli ioni alchilici. Comunque non ci sono

caratteristiche che permettono di stabilire la locazione del doppio legame, poiché questo può spostarsi in ogni posizione quando la catena alchilica è ionizzata per impatto elettronico nello spettrometro di massa. Così, quasi tutti gli acidi *cis*- e *trans* alchenoici hanno virtualmente spettri identici.

In Figura 5.5 è riportato lo spettro di massa dell'acido linoleico metil estere. E' visibile un abbondante ione molecolare ( $m/z = 294$ ) e gli ioni derivati dalla perdita di metanolo e dello ione di McLafferty ( $m/z = 263$  e  $220$  rispettivamente).



**Figura 5.4:** Spettro di massa dell'acido oleico metil estere

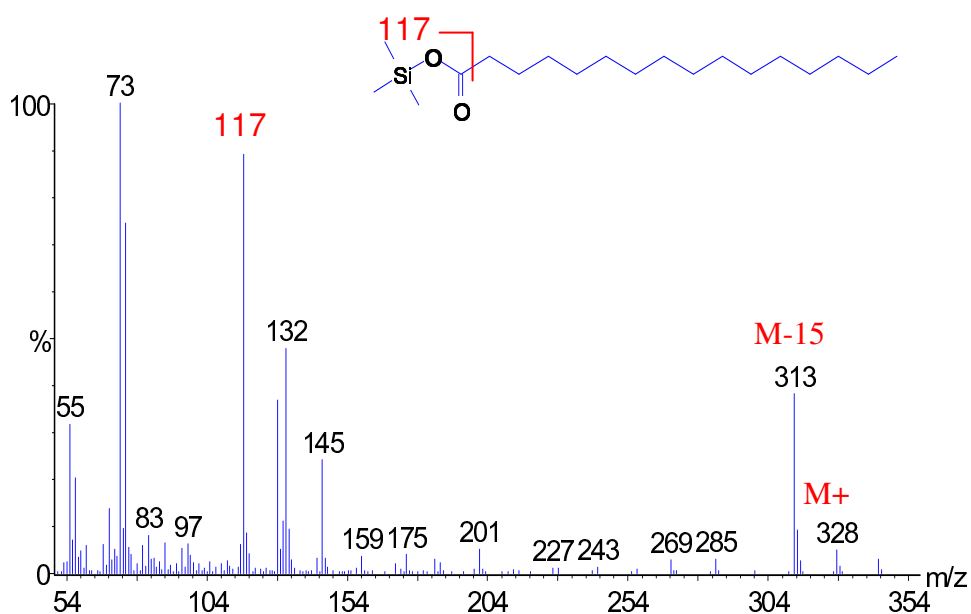




**Figura 5. 5:** Spettro di massa dell'acido linoleico metil estere

Lo ione di McLafferty ( $m/z = 74$ ) invece non è molto abbondante. Così come per gli acidi monoinsaturi, anche per i dienoici non c'è uno ione evidente che può servire a stabilire la posizione dei doppi legami.

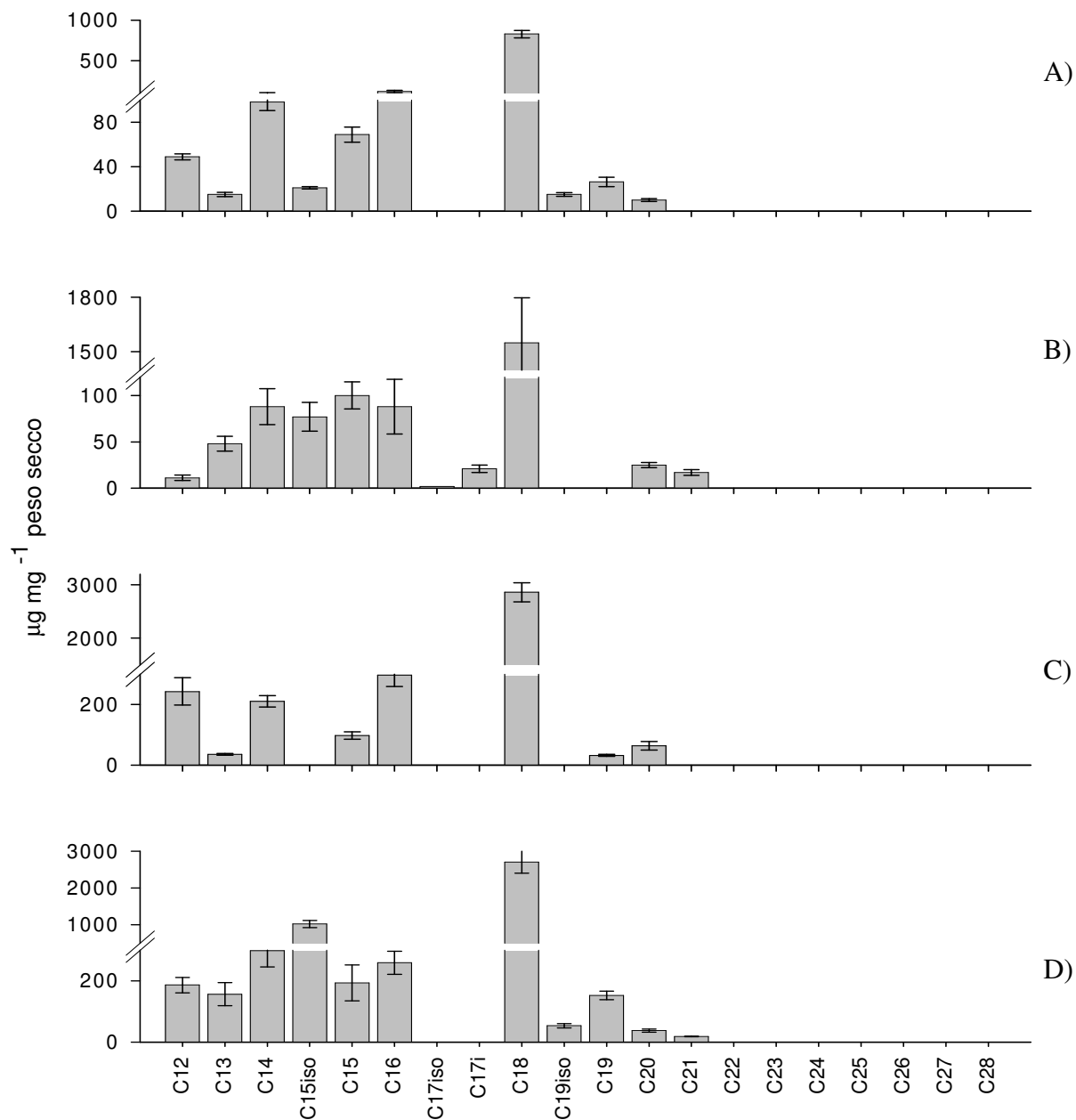
Gli spettri degli acidi saturi trimetilsililesteri (Figura 5.6) invece sono caratterizzati dai due picchi a  $m/z$  73 e 117 che corrispondono rispettivamente ai frammenti  $[(CH_3)_3Si]^+$  e  $[(CH_3)_3SiCO_2]^+$ . Lo ione molecolare non è molto abbondante ma è riconoscibile in quanto preceduto da un picco molto intenso a M-15, determinato dalla perdita di un metile dal gruppo trimetilsilile.



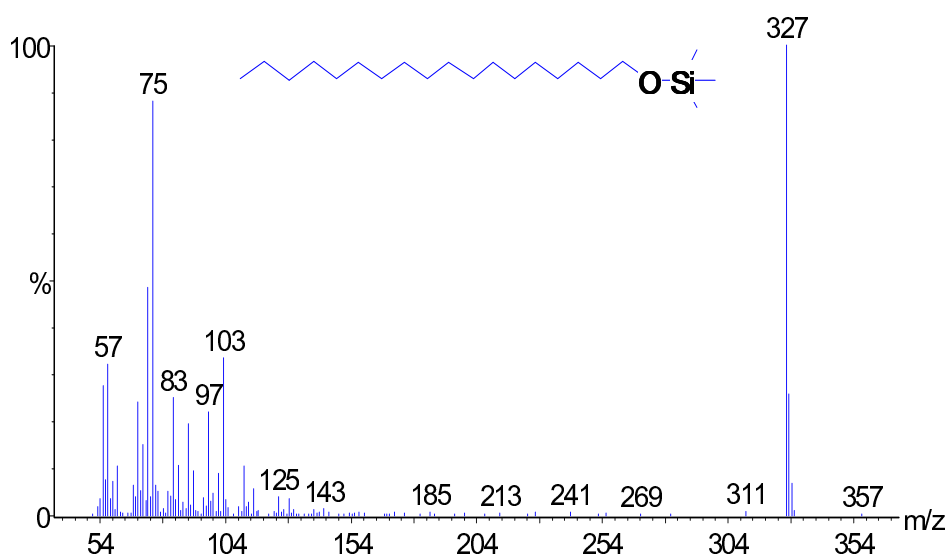
**Figura 5. 6:** spettro di massa dell'acido esadeanoico trimetilsililestere

### 5.2.2 Alcanoli

Per ogni campione umico, gli alcoli alifatici rappresentano la seconda classe in ordine di abbondanza (Tabella 5.1). Anche questi prodotti possono derivare dai biopoliesteri, ma



**Figura 5.7:** Concentrazione (µg/g peso secco) e distribuzione degli alcoli alifatici analizzati negli estratti organici dei campioni umici: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3.



**Figura 5. 8:** spettro di massa dell'octadecano trimetilsilil etere

possono risultare anche dalla bioossidazione degli *n*-alcani (McKenna, 1964; Hunt, 1972) , o, in ambienti anaerobici, dalla riduzione enzimatica degli acidi grassi (Kolattukudy, 1975). In Figura 5.7 sono riportate le distribuzioni degli alcoli ottenuti dai campioni umici studiati. Essi spaziano dal C<sub>12</sub> al C<sub>28</sub>, esibendo un'ampia predominanza dei termini a numero pari rispetto a quelli a numero dispari. Il termine a 18 atomi di carbonio costituisce la parte più importante degli alcoli alifatici identificati, indicando una possibile origine dalla riduzione enzimatica degli acidi grassi corrispondenti. Anche per questa classe gli omologhi a lunga catena non rappresentano una Frazione importante e la presenza dell'*iso*-pentadecanolo suggerisce una attività batterica (Grasset e Amblès, 1998b). Inoltre, l'ammontare di alcoli alifatici rilasciato dalle frazioni umiche diminuisce con l'aumentare delle dimensioni molecolari apparenti (Tabella 5.1).

I prodotti derivatizzati degli alcoli alifatici si presentano esclusivamente come trimetilsilileteri, indicando che per i gruppi funzionali alcolici la sililazione è una

derivatizzazione più efficace della metilazione. In Figura 5.8 è riportato lo spettro di massa dell'octadecano trimetilsililetere che è il composto più abbondante tra agli alcoli alifatici. Esso è caratterizzato dallo ione  $m/z$  75 corrispondente al gruppo  $[(CH_3)_2SiOH]^+$  e anche dagli ioni  $m/z$  73, 89 e 103, i cui frammenti sono generalmente presenti negli spettri di massa dei trimetilsilileteri degli alcoli alifatici.

### 5.2.3 Carboidrati

I carboidrati rappresentano la più importante componente vegetale sia come riserva energetica sia come costituente strutturale. Sebbene nel suolo siano rapidamente degradati dall'attività batterica, essi possono essere incorporati nelle sostanze umiche sia come monosaccaridi liberi sia come oligosaccaridi, derivanti dalla parziale degradazione di polisaccaridi quali cellulosa, emicellulosa, amido, etc. Questi composti sono, infatti, una comune costituente delle sostanze umiche, in accordo a studi effettuati con pirolisi (Fabbri et al., 1996; Schulten et al., 1998; Lu et al., 2000; González-Vila et al., 2001; Page et al., 2002; Lehtonen et al., 2000). Semplici zuccheri come ribosio e glucosio sono stati identificati anche attraverso ESI-MS (Kramer e al., 2001). Inoltre tecniche 1D- e 2D-NMR hanno mostrato la presenza di catene di glucosio (Simpson e al., 2001) e altri carboidrati (Simpson e al., 2002; Fan e al., 2000; Simpson e al., 2001; Hertkorn e al., 2002; Mao e al., 2001) nelle sostanze umiche. Anche spettri DOSY-NMR di sostanze umiche hanno rivelato la presenza di brevi catene polisaccaridiche di 3–8 monomeri (~600–1500 Da) (Simpson e al., 2002a,b; Simpson, 2002).

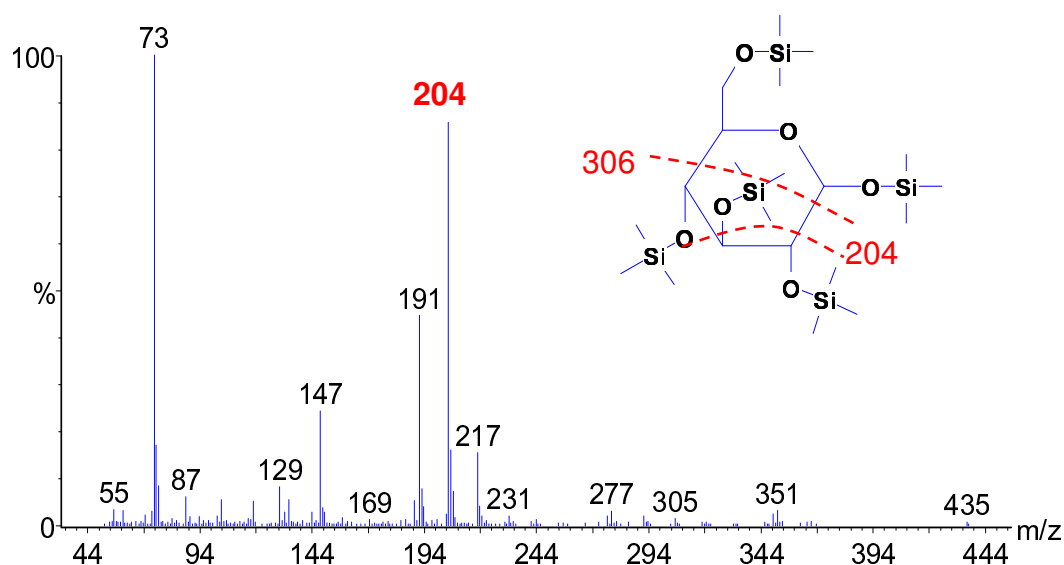
Una piccola ma significativa quantità di carboidrati non legati strutturalmente alla matrice umica è stata identificata in tutti i campioni di questa tesi. Poiché i carboidrati non sono liposolubili, è possibile che il materiale umico estratto con solventi organici sia stato costituito da aggregati con domini idrofilici interni a strutture

idrofobiche, tali da permettere la coestrazione di molecole polari. E' stata infatti riconoscibile nei campioni unici una varietà di prodotti derivanti dagli zuccheri: monosaccaridi e glicosidi pertrimetilsililati, lattoni epimeri degli acidi deossialdonici trimetilsililati, e i lattoni isomeri dell'acido 3-deossi-2-idrossimetil pentonico trimetilsililato. I monosaccaridi pertrimetilsililati sono il normale prodotto dei monosaccaridi sottoposti a derivatizzazione con BSTFA-trimetilclorosilano. Gli spettri di questi prodotti sono facilmente riconoscibili dagli ioni  $m/z$  191, 204, e 217, come è visibile in Figura 5. 9, dove viene riportato lo spettro dell'1,2,3,4,6-penta-O-trimetilsilil- $\alpha$ -D-glucopiranosio. Lo ione  $m/z$  217 origina dal frammento che deriva dalla scissione dei carboni 2, 3 e 4 (M 306), con perdita di un gruppo TMSiO. Lo ione 204 origina da un frammento composto da due carboni, probabilmente C-2 e C-3, e i rispettivi gruppi TMSiO, mentre lo ione  $m/z$  191 deriva da un frammento che si forma attraverso un riarrangiamento ed è composto da due gruppi TMSiO e da un CH derivante dal C-1 della molecola di glucosio. Uno dei gruppi TMSiO deriva dal C-3 ed è riarrangiato al C-1 (De Jongh e al., 1968). I glicosidi pertrimetilsililati invece derivano dalla formazione di acetali durante la metilazione e la successiva trisililazione con BSTFA-trimetilclorosilano. Gli spettri dei glicosidi presentano gli stessi picchi dei monosaccaridi pertrimetilsililati, tranne per lo ione  $m/z$  191 che ha una intensità molto inferiore. Appare più importante lo ione  $m/z$  133, che deriva dallo stesso frammento ma con gruppo  $\text{CH}_3\text{O}$  dei glicosidi al posto del gruppo TMSiO. Benchè negli spettri di massa dei pertrimetilsilil-derivati lo ione molecolare sia generalmente assente, è possibile comunque distinguere varie classi di zuccheri sulla base di alcuni rapporti di  $m/z$  caratteristici (DeJongh e al.,1968; Bleton1 e al., 1996; Martin e al 2001). Così con

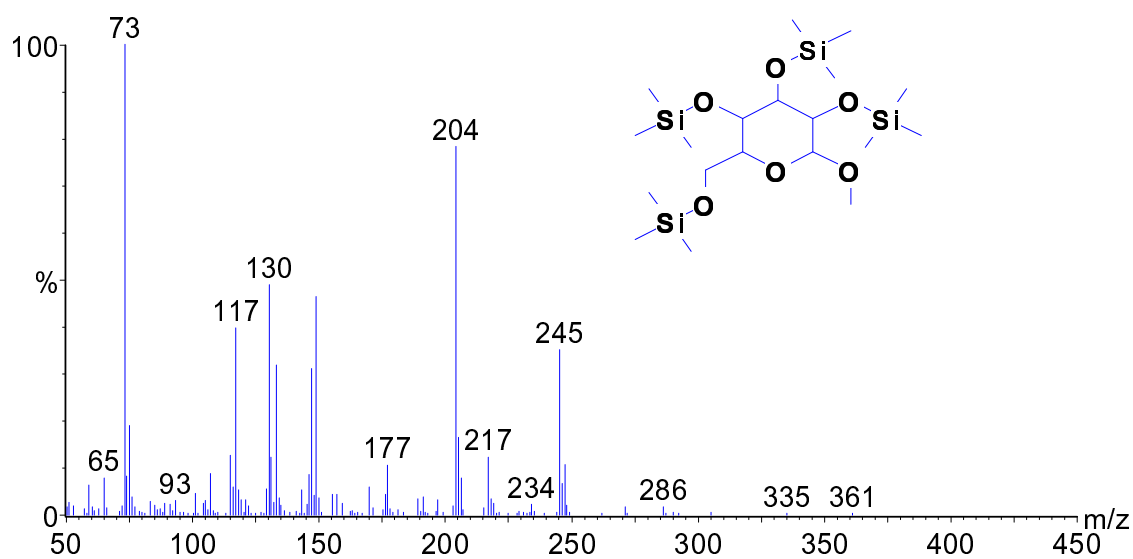
l'aiuto della libreria NIST-MS è stato possibile individuare i composti riportati in Tabella 5.2

**Tabella 5.2** Lista dei prodotti derivati dai carboidrati analizzati per GC-MS negli estratti organici dei campioni umici e relativi tempi di ritenzione (TR).

Composto	T.R.
metil 2,3,5,6-tetrakis-O-(TMS)- $\alpha$ -D-glucofuranoside	12.23
metil 2,3,5-tris-O-(TMS)- $\alpha$ -D-ribofuranoside	12.55
metil 2,3,4,6-tetrakis-O-(TMS)- $\alpha$ -D-mannopiranoside	12.97
tetrakis(TMS) 2-deossi-galattopiranosio	13.19
metil 2,3,4-tris-O-(TMS)- $\alpha$ -D-xylopiranoside	14.82
2-deossi-1,3,4,5-tetrakis-O-(TMS)- D-erythro-pentitolo	14.89
Acido 2-deossi-3,4,5-tris-O-(TMS)- erythro-pentonico TMS estere - $\gamma$ -	15.02
metil 2,3,4-tris-O-(TMS)- $\alpha$ -D- xylopiranoside	15.28
Acido D-arabino-esoonico 3-deossi-2,5,6-tris-O-(TMS)- $\gamma$ -lattone	15.42
Acido 3-deossi-2,5-bis-O-(TMS)-2-C-[[ (TMS)ossi]metil]- D-threo-pentonico - $\gamma$ -lattone	15.97
metil 2,3,5,6-tetrakis-O-(TMS)- $\alpha$ -D- glucofuranoside	17.5
Acido D-arabino-esoonico 3-deossi-2,5,6-tris-O-(TMS)- $\gamma$ -lattone	17.87
Acido 3-deossi-2,5,6-tris-O-(TMS)- D-ribo-esonico lattone	18.32
metil 2,3,4,6-tetrakis-O-(TMS)- $\alpha$ -D-mannopiranoside	18.23
metil 2,3,4,6-tetrakis-O-(TMS)- $\beta$ -D-galattopiranoside	19.31
1,2,3,5,6-pentakis-O-(TMS)- $\beta$ -D-galattofuranosio	19.95
metil 2,3,4,6-tetrakis-O-(TMS)- $\beta$ -D-galattopiranoside	20.07
1,2,3,4,5,6-esakis-O-(TMS)- myo-inositolo	20.26
metil 2,3,4,6-tetrakis-O-(TMS)- $\alpha$ -D-mannopiranoside	20.67
metil 2,3,4,6-tetrakis-O-(TMS)- $\alpha$ -D-mannopiranoside	21.15



**Figura 5. 9:** Spettro di massa dell'1,2,3,4,6-penta-O-trimetilsilil- $\alpha$ -D-glucopiranosio

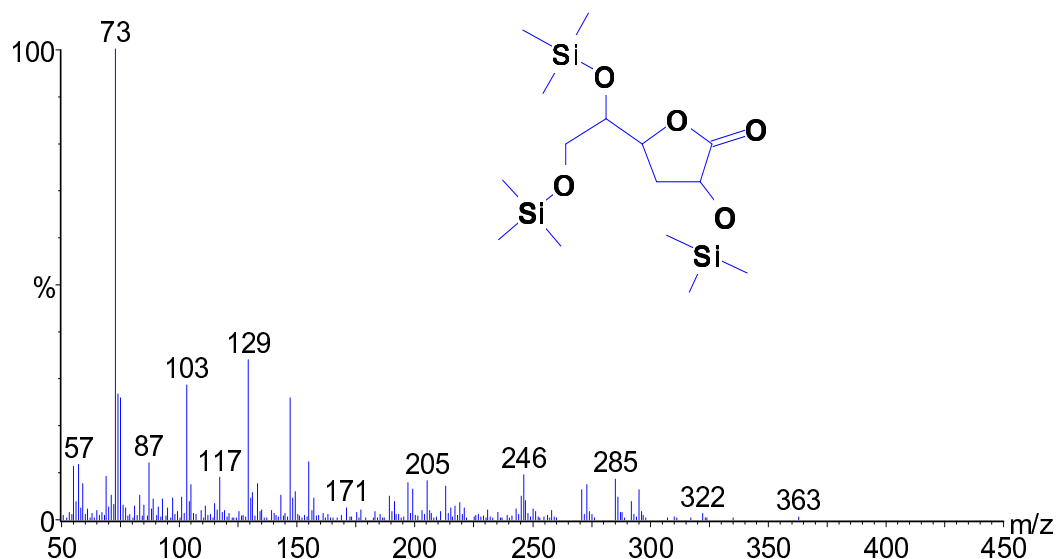


**Figura 5.10 :** Spettro di massa del metil 2,3,4,6-tetrakis-O-(trimetilsilil)- $\alpha$ -D-glucopiranoside

La formazione degli acidi deossialdonici trimetilsililati è più complessa. In letteratura è riportato che la degradazione alcalina, a moderata temperatura, di zuccheri

riducenti produce i cosiddetti “acidi saccarinici”, attraverso un meccanismo che implica una rapida isomerizzazione per enolizzazione, eliminazione d’acqua e riarrangiamento acido benzilico di un composto con due carbonili in  $\alpha$  per produrre un acido deossialdonico (Fabbri e Helleur, 1999). La metilazione in ambiente acido può implicare l’enolizzazione e attraverso un meccanismo simile si possono avere gli stessi prodotti ottenuti dalla termochemolisi che, per la successiva derivatizzazione eseguita con BSTFA, presentano i gruppi idrossilici trimetilsililati.

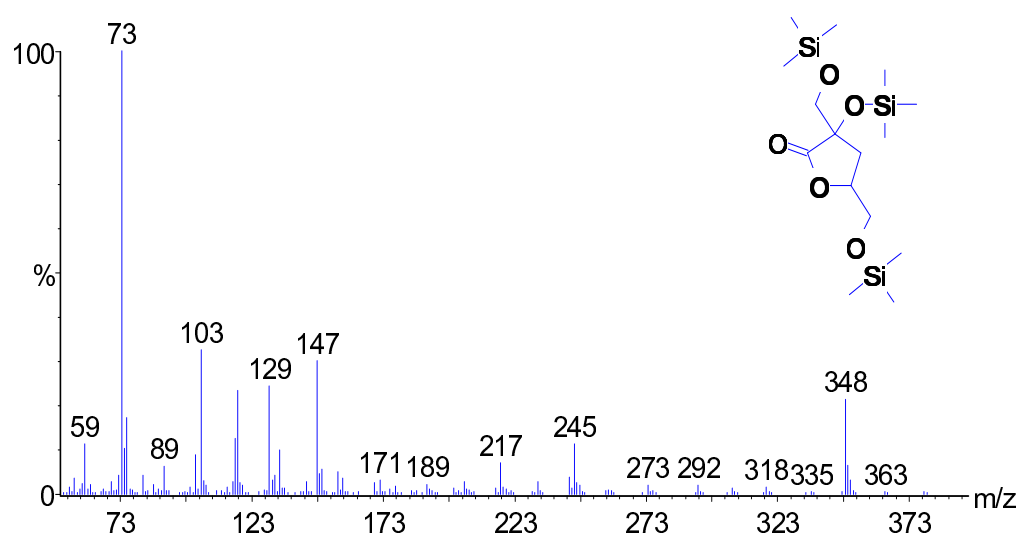
In Figura 5.11 è riportato lo spettro di massa dell’acido D-arabino-esonico, 3-deossi-2,5,6-tris-O-(trimetilsilil)- $\gamma$ -lattone, uno dei maggiori prodotti derivatizzati dei monosaccaridi identificati con la GC/MS. Lo ione molecolare non è chiaramente osservabile, ma si può identificare dalla presenza di un flebile ione  $m/z$   $[M-15]^+$ . Il picco base corrisponde allo ione  $m/z$  73 dovuto al gruppo trimetilsilile, ed è, inoltre, presente un picco caratteristico degli acidi deossialdonici  $m/z$  129.



**Figura 5. 11:** Spettro di massa dell’acido, 3-deossi-2,5,6-tris-O-(TMS)- D-arabino-esonico.-gamma.-lattone



Fabbri e Helleur (1999), in un esperimento di termochemolisi con idrossido di tetrametrilmmonio, riportano che la cellulosa invece di produrre gli acidi esonici produce gli isomeri dell'acido 3-deossi-2-idrossimetil pentonico. Negli estratti organici dei campioni unici di questa tesi sono stati identificati anche questi prodotti nella forma di lattone trimetilsililato. In Figura 5.12 è riportato lo spettro di massa dell'epimero *treo*, che è risultato il più abbondante, e riconosciuto per mezzo libreria NIST-MS.



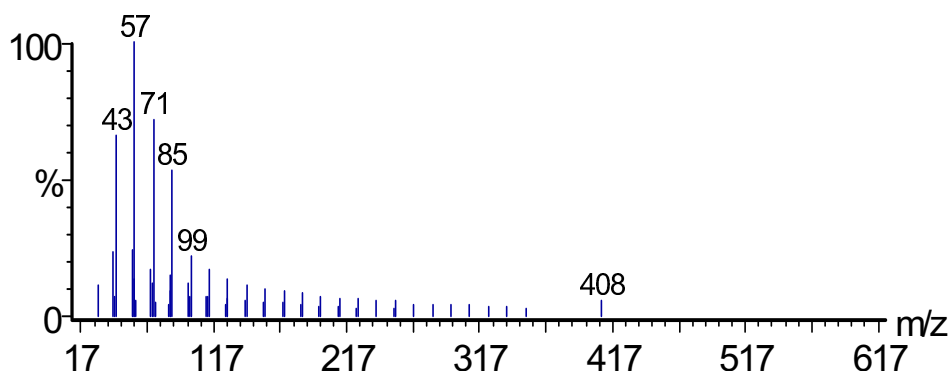
**Figura 5.12:** Spettro di massa del lattone dell'acido 3-deossi-2,5-bis-O-(trimetilsilil)-D-C- [[(trimetilsilil)ossi]metil]- D-threo-pentonico.

Tuttavia anche alcuni saccaridi, per esempio il lattosio, un disaccaride galattosio-1-4-glucosio, può fornire prodotti simili a quelli rilasciati dai monosaccaridi (Fabbri e Helleur, 1999). In ogni caso, con la dovuta cautela, i lattoni isomeri dell'acido 3-deossi-2-idrossimetil pentonico possono dare informazioni utili per distinguere i monosaccaridi dagli oligosaccaridi. I due lattoni isomeri dell'acido 3-deossi-2-idrossimetil pentonico non sono molto abbondanti tra la componente non legata strutturalmente, indicando una prevalenza dei monosaccaridi liberi.

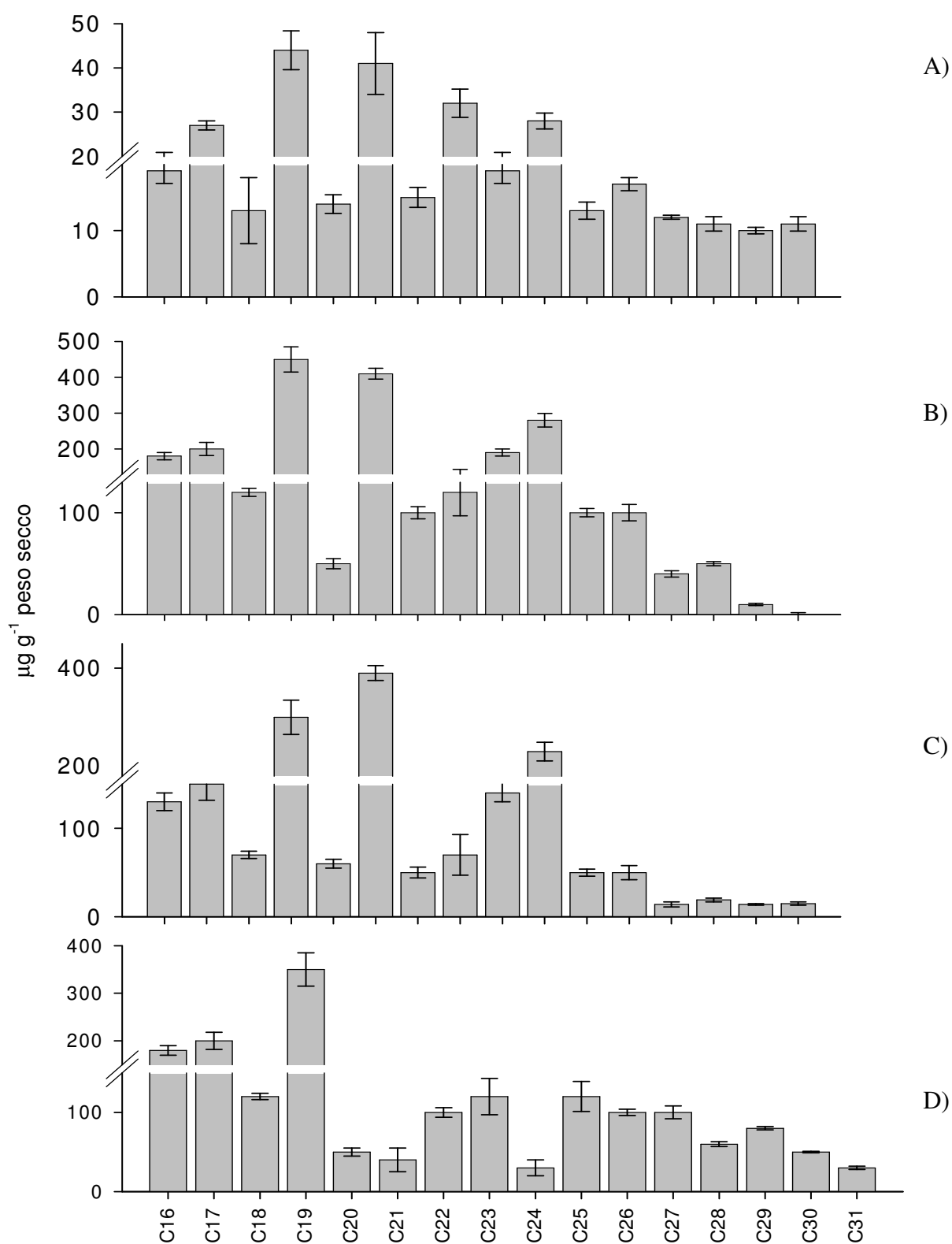
#### 5.2.4 Alcani

Gli *n*-alcani, accompagnati anche da alcuni alcani ramificati, sono identificati tra la componente strutturalmente non legata e vanno dal C<sub>16</sub> al C<sub>30</sub>, con una distinta prevalenza dei termini a numero dispari di carbonio rispetto a quelli pari, ed indicando una origine dagli strati di cera delle piante. La Frazione 1 è la più ricca di alcani seguita dalla Frazione 3 e dalla Frazione 2 (Figura 5.14).

Gli spettri di massa degli *n*-alcani mostrano un picco base a *m/z* 57 e presentano una serie di picchi di intensità decrescente che differiscono di 14 Da. Di solito il primo frammento ionico dopo lo ione molecolare è a *M*-29. Gli ioni molecolari decrescono di intensità all'incrementare della lunghezza della catena, ma generalmente possono essere ancora riconosciuti a C<sub>40</sub>. Invece, gli alcani ramificati presentano uno ione molecolare che decresce di intensità all'aumentare delle ramificazioni, e perciò è spesso assente. Inoltre vi è una frammentazione prevalente nei punti ramificati, offrendo degli spettri di difficile interpretazione. In Figura 5.13 viene riportato lo spettro di massa di un tipico *n*-alcano a 19 atomi di carbonio.



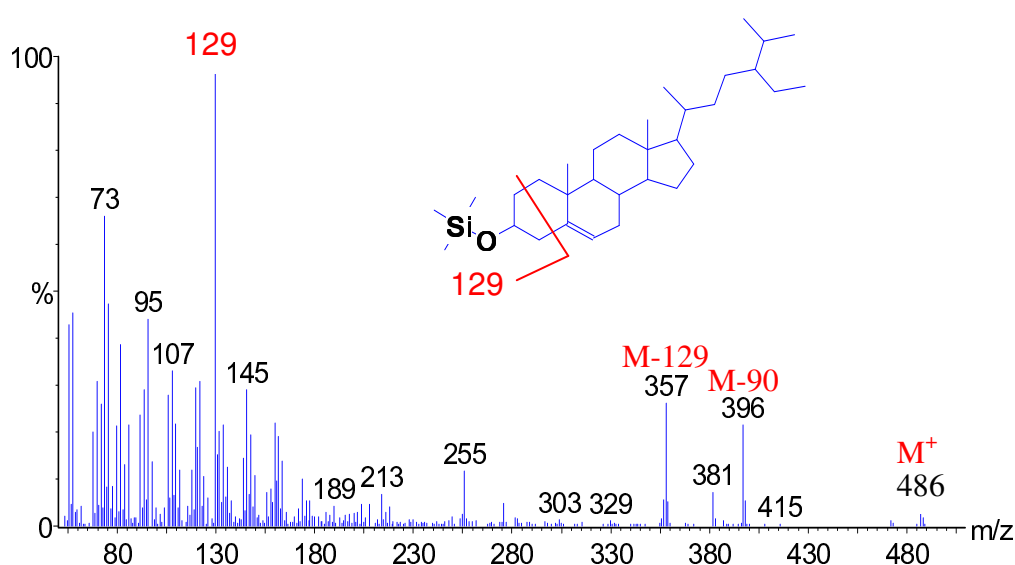
**Figura 5. 13** Spettro di massa del nonacosano



**Figura 5.14:** Concentrazione (µg/g) e distribuzione degli alcani analizzati negli estratti organici dei campioni umici: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3.

### 5.2.5 Steroidi e terpenoidi

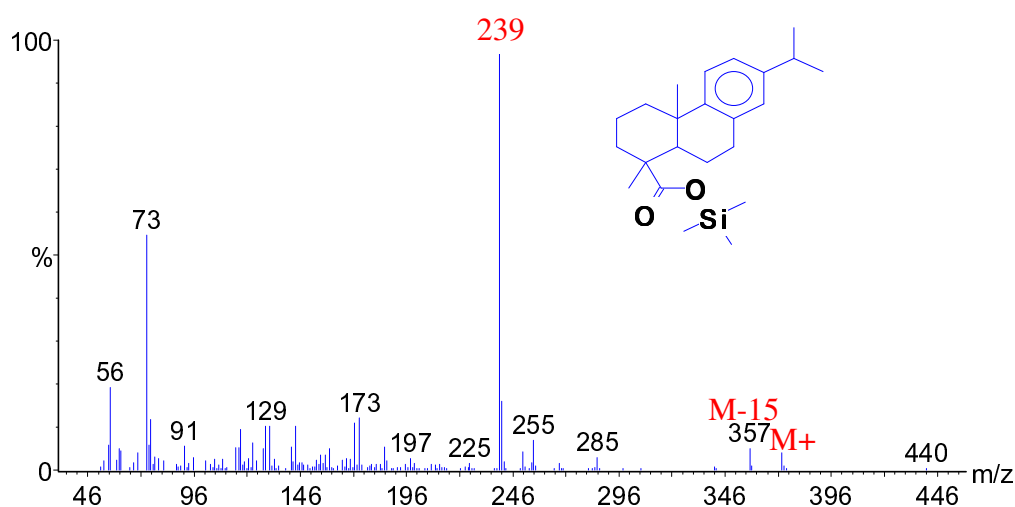
Piccole quantità di steroidi e terpenoidi sono identificati nella maggior parte dei campioni. Gli steroidi ( $C_{28}$  e  $C_{29}$ ) sono ampiamente distribuiti nel regno vegetale, usualmente nelle cere, e riflettono per questo l'input di residui dai vegetali superiori (Brassell et al., 1983; Oros and Simoneit, 1999).



**Figura 5.15:** Spettro di massa del  $\beta$ -sitosterolo trimetilsililetere

Nei cromatogrammi degli estratti organici dai campioni umici sono identificabili i derivati trimetilsililati di alcuni steroidi quali il  $3\alpha$ -Cholest-5-ene, il  $\beta$ -sitosterolo, il  $5\beta$ -cholest-23-ene, e il cholesta-4,6-dien-3-olo. Negli spettri di massa, gli steroidi TMSilati sono caratterizzati dallo ione  $m/z$  129 che origina dal frammento dell'anello A (Figura 5.15). Altri ioni caratteristici sono  $m/z$   $[M-90]^+$ , che origina dalla perdita dello ione  $(CH_3)_3SiOH$  dallo stesso ione  $m/z$   $[M-129]^+$ . Lo ione molecolare non sempre è identificabile.

I terpeni si trovano usualmente nelle resine degli alberi (Yu e altri, 2000). Qui è stato identificato solo l'acido deidroabietico, un diterpene polare (quattro unità isopreniche), che è risultato presente nella maggior parte degli estratti. Questo composto deriva dalla deidrogenazione dei terpeni durante la combustione delle biomasse (Simoneit, 2002; Oros et al., 2002) ed è riportato come composto dominante nel fumo dei pini (Simoneit et al., 1993). Nello spettro di massa di questo composto (Figura 5.16), contrariamente agli steroidi, è visibile il picco corrispondente allo ione molecolare. Inoltre, è identificabile lo ione  $m/z$  357 [M-15] e il picco caratteristico  $m/z$  239, che deriva dalla scissione del gruppo carbossilico e del metile legato al carbonio e dal rilascio di un idrogeno.



**Figura 5. 16 :** Spettro di massa dell'acido deidroabietico trimetilsililetere

### 5.3 Componente rilasciata dopo transesterificazione e dopo metanolisi.

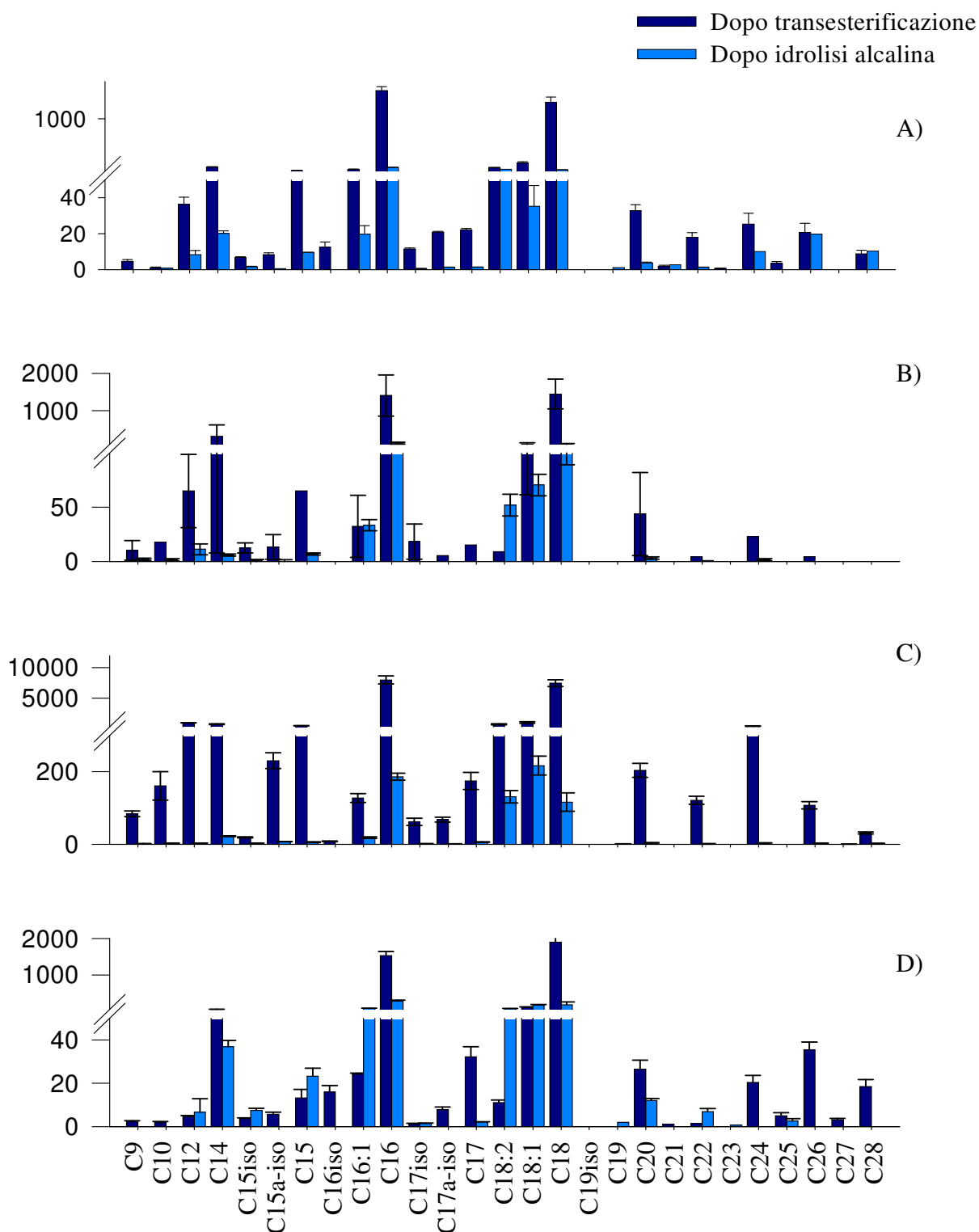
Nella Tabella 5.3 sono mostrate tutte le classi di composti identificate nelle frazioni organiche ottenute dopo transesterificazione e la metanolisi alcalina dell'HA e delle frazioni HPSEC. Sono altresì riportate le rese di estrazione, gli intervalli

dimensionali e gli omologhi dominanti. Sia dopo la transesterificazione, sia dopo la metanolisi alcalina la classe più abbondante di composti identificati nelle frazioni organiche è ancora quella degli acidi grassi.

**Tabella 5.3** Rese ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso secco) e composizione<sup>a</sup> delle maggiori classi di composti rilasciate dopo transesterificazione e dopo metanolisi basica.

	HA		Frazione 1		Frazione 2		Frazione3	
Composti	DL <sup>b</sup>	FL <sup>c</sup>	DL	FL	DL	FL	DL	FL
Acidi <i>n</i> - alcanoici	3710 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub>	360 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub>	3580 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub>	510 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub>	20670 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub>	690 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub>	4040 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub>	840 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub>
Insaturi%	11.3	30.2	4.5	36.7	11.2	50.7	3.0	33.3
Alcoli	480(C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	40(C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	640(C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	70(C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	2020(C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	70(C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	880(C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	140(C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>
Alcani	200	280	1660	20	440	140	130	130
Carboidrati	150	140	160	-	680	150	4330	780
Di-, tri- idrossiacidi	20	10	-	-	658	-	100	-
$\omega$ - idrossiacidi	60	-	50	-	191	-	10	-
$\alpha,\beta$ - idrossiacidi	120	-	60	-	233	-	130	-
Composti aromatici	1310	40	2990	80	5070	200	1070	60
Steroidi	110	20	200	20	340	60	80	40
Diterpenoidi	50	10	-	10	150	20	-	20

a. Intervallo da Ci a Cj; in parentesi gli omologhi dominanti.



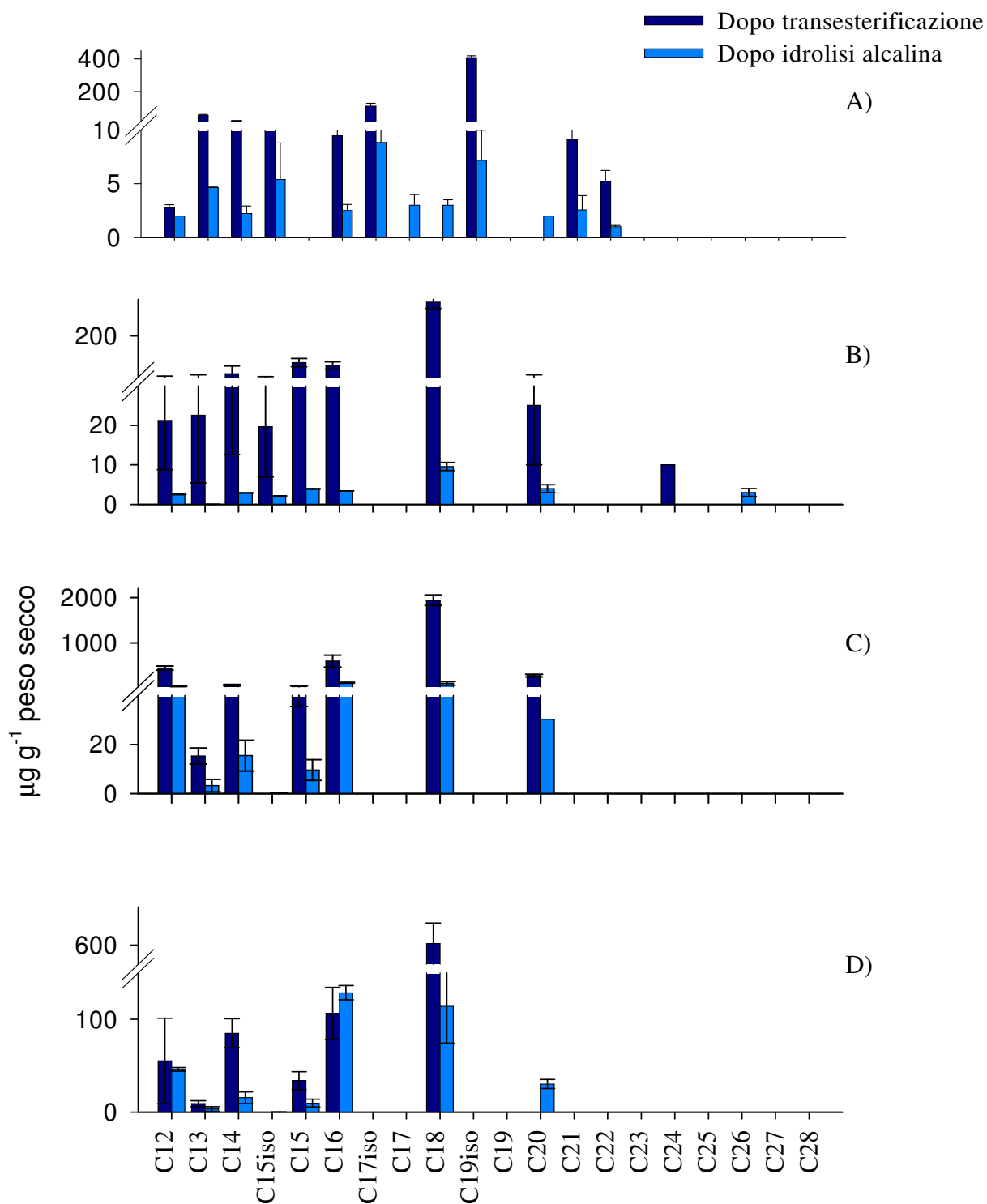
**Figura 5. 17** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$ ) e distribuzione degli Acidi Grassi negli estratti organici ottenuti dopo transesterificazione e dopo metanolisi dei campioni umici: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3.

Tuttavia, le rese sono molto minori dopo la metanolisi alcalina rispetto a quelle ottenute dopo transesterificazione.

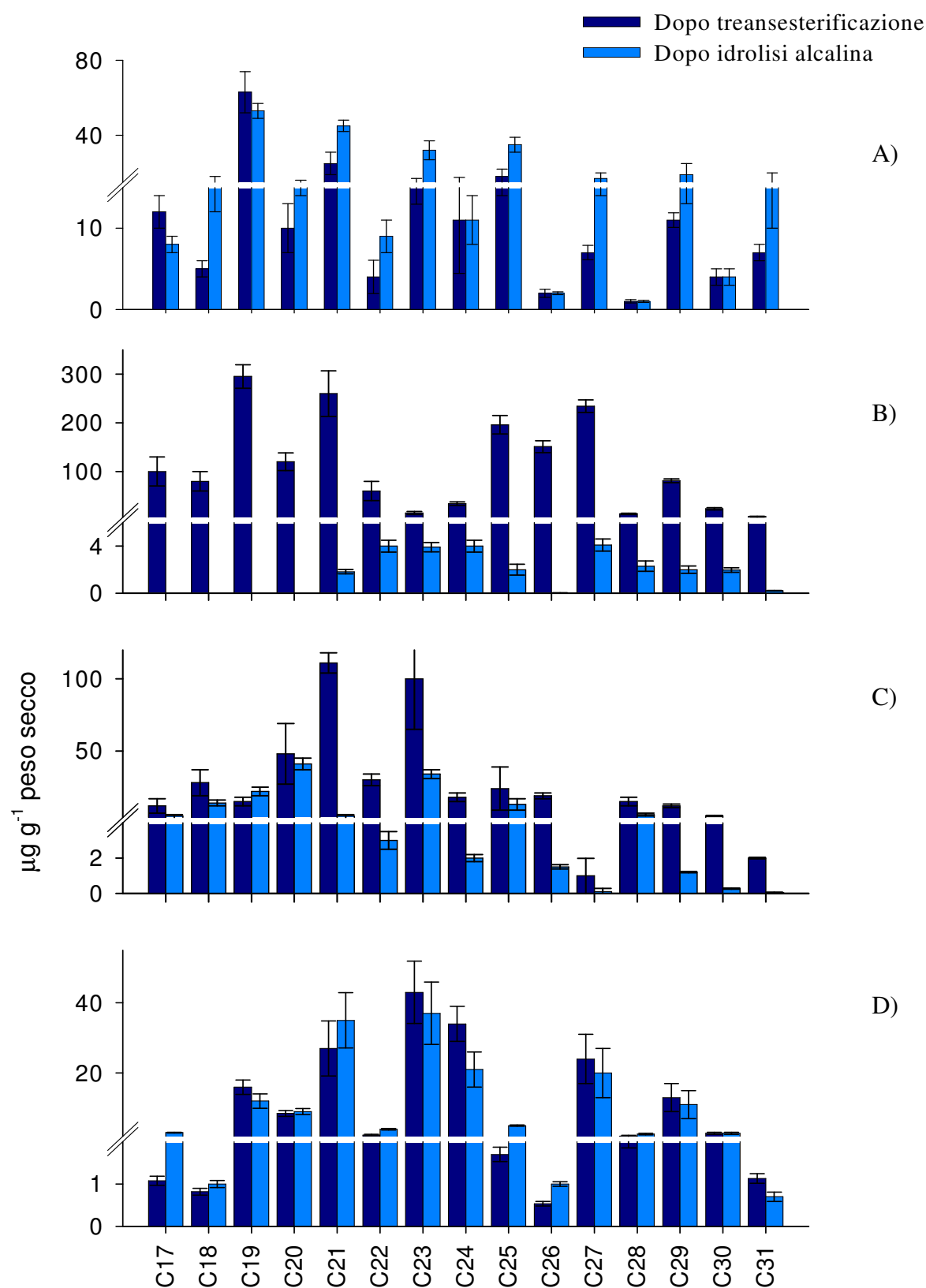
Le distribuzioni dei composti omologhi degli acidi grassi nei campioni umici sono mostrate in Figura 5.17. Le distribuzioni ottenute dopo transesterificazione non sono molto differenti da quelle della componente libera, mentre dopo idrolisi alcalina l'abbondanza relativa degli acidi insaturi incrementa (Tabella 5.3). Dalla Frazione 2 si ottiene la più ampia resa dopo transesterificazione seguita dalla Frazione 1 e dalla Frazione 3, mentre dopo metanolisi le rese incrementano con il diminuire delle dimensioni molecolari apparenti delle frazioni umiche. Questa relazione concentrazione-dimensioni molecolari osservata per le rese ottenute dopo metanolisi è inversa a quella ottenuta per la componente libera (Tabella 2).

Anche n-alcoli, n-alcani e steroidi sono identificati sia dopo transesterificazione sia dopo metanolisi. Le distribuzioni delle serie di omologhi di alcoli e alcani (Figure 18 e 19) sono simili a quelle osservate tra i composti liberi, sebbene le rese siano diverse. Inoltre anche per queste classi di composti la relazione tra concentrazione e dimensioni molecolari apparenti delle frazioni umiche risulta essere tendenzialmente inversa rispetto a quella ottenuta per la componente libera, tranne che per l'estratto organico dopo transesterificazione della Frazione 2, dalla quale con eccezione degli alcani, è rilasciata una quantità molto maggiore di ciascuna delle classi descritte.





**Figura 5. 18** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$ ) e distribuzione degli Alcoli analizzati negli estratti organici ottenuti dopo transesterificazione e dopo metanolisi dei campioni umici: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3.

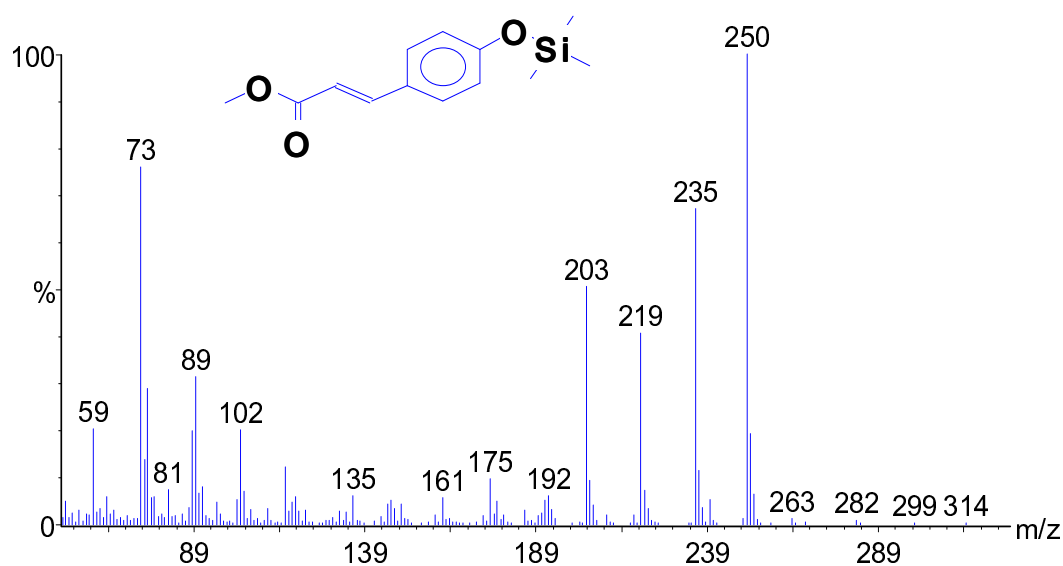


**Figura 5. 19** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$ ) e distribuzione degli *n*-Alcani analizzati negli estratti organici ottenuti dopo transesterificazione e dopo metanolisi dei campioni umici: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3.

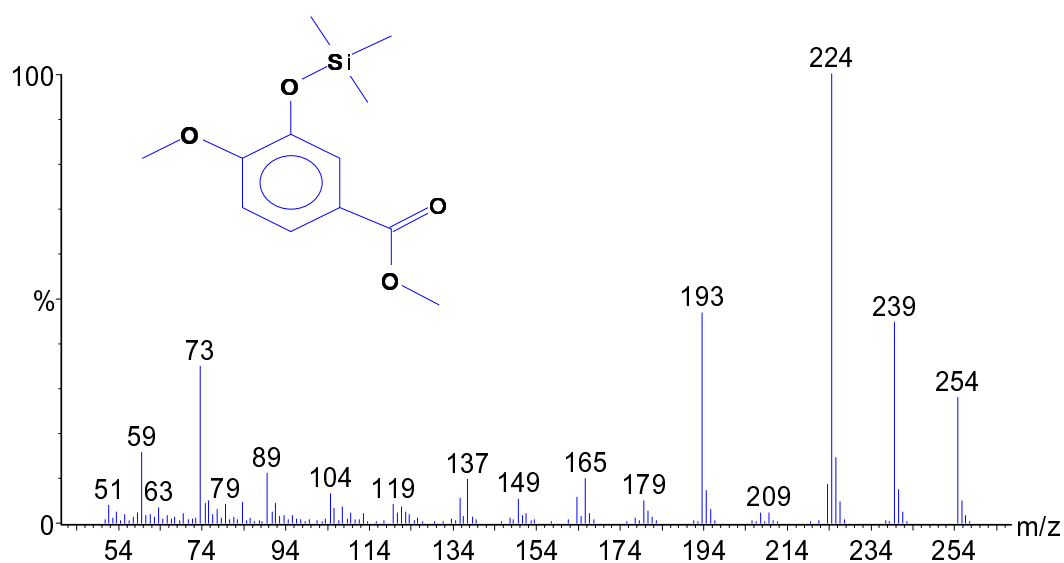
### 5.31 *Composti aromatici*

I composti aromatici sono il secondo gruppo più abbondante rilasciato per transesterificazione, mentre sono risultati di minore importanza relativa nel rilascio di composti per idrolisi alcalina. I composti aromatici più abbondanti in ciascun campione sono l'acido 3-fenilprop-2-enoico metil estere, con uno o due gruppi metossilici (acido p-coumarico e acido ferulico), che sono parte sia dei domini aromatici della suberina, usualmente legati come esteri (Kolattukudy, 1980), sia delle lignine. Inoltre sono stati identificati gli acidi mono, di e tri metossi benzoici, l'acetoguaiacolo e la corrispondente aldeide, probabilmente derivati dalla lignina. Dall'HA è stata ottenuta la resa assoluta più bassa di composti aromatici, ma più alta come percentuale relativa, mentre, tra le frazioni HPSEC, la Frazione 2 è risultata la più ricca di composti aromatici. Sihombing et al., (1996) hanno suggerito che i derivati della lignina tendono ad accumularsi in frazioni di peso molecolare intermedio. Questa tendenza, che tuttavia non è supportata da molti altri lavori, sembra invece essere confermata dai risultati di questa tesi. La presenza di derivati della lignina legati alla matrice umica con deboli legami esterei può essere responsabile della forte ritenzione di altri composti non strutturalmente legati e non estraibili con i soli solventi organici, ma solo dopo transesterificazione. In questo modo l'ampia quantità di derivati della lignina estratti dalla Frazione 2 può anche spiegare la concomitante maggiore quantità di altri composti estratti dalla Frazione 2 dopo transesterificazione.

In Figura 5.20 e 21 sono riportati gli spettri di massa dei prodotti derivatizzati dell'acido ferulico (acido 3-metossi-4-trimetilsililossicinnamico) e dell'acido 3-metossi-4-idrossibenzoico. I picchi molecolari sono ben visibili, inoltre sono osservabili i picchi a  $[M-15]^+$  e il picco a  $[M-31]^+$ .



**Figura 5.20:** spettro di massa dell'acido p-(trimetilsilossi)-cinnamico metil estere



**Figura 5.21:** spettro di massa dell'acido 4-metossi-3-[(Trimetilsilil)ossi] benzoico metil estere

### 5.3.2 Carboidrati

I carboidrati sono identificati nella Frazione 1 e nell'HA specialmente come componente strutturalmente non legata, mentre nella Frazione 2 e nella Frazione 3 sono

stati maggiormente rilasciati dopo le reazioni idrolitiche e quindi identificabili come componente debolmente e fortemente legata alla matrice umica. Questa classe di composti appare gradualmente più intimamente associata alla matrice umica al diminuire delle dimensioni molecolari apparenti delle frazioni. I lattoni isomeri dell'acido 3-deossi-2-idrossimetilpentonico sono rilasciati in quantità maggiori dopo transesterificazione e metanolisi rispetto all'estrazione con solventi organici. In particolare, essi sono stati rilasciati per metanolisi più dalla Frazione 3 che dalla Frazione 1, suggerendo che gli oligosaccaridi sono prevalenti nella Frazione con dimensioni molecolari minori. Questo è in accordo con le diverse evidenze che indicano che la Frazione 3 contiene un maggior numero di microdomini idrofilici rispetto alla Frazione 1 più apolare

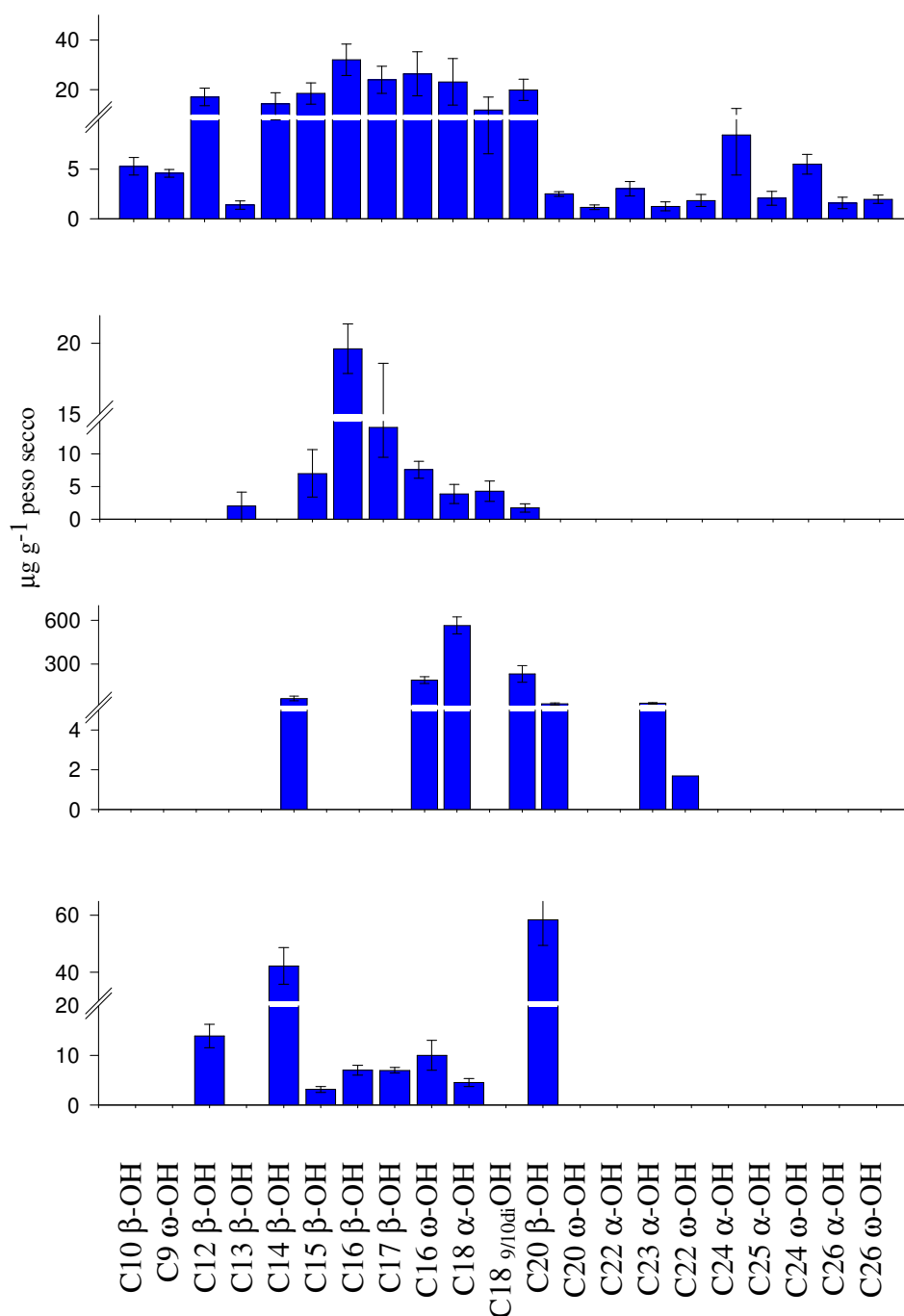
### *5.3.3 Acidi idrossilati*

In un precedente lavoro, la transesterificazione dell'HA non trattato (Fiorentino et al., 2006) aveva rilasciato i composti derivati dai biopolimeri come gli acidi  $\omega$ -idrossialcanoici, gli acidi alcanoici di- e tri- idrossilati, e gli acidi  $\alpha,\omega$ -alcandioici. L'acido umico utilizzato in questa tesi è stato prima titolato e poi filtrato su microfibre di vetro per renderlo completamente solubile dopo liofilizzazione. L'operazione di filtrazione deve aver separato i biopolimeri insolubili in acqua, riducendo fortemente la presenza di questi composti negli estratti di questa tesi. Infatti, i diacidi a lunga catena, comunemente associati alla suberina non sono stati identificati. Sono stati identificati in piccole quantità solo alcuni diacidi a catena corta, di probabile origine batterica. Il composto più abbondante è stato l'acido nonandioico, probabilmente derivato dalla

degradazione batterica attraverso l'ossidazione per via enzimatica degli acidi insaturi in posizione 9 come l'acido oleico (Regert et al., 1998; Grasset and Amblès, 1998).

Nell'estratto dopo transesterificazione sono state identificate solo piccole quantità di idrossiacidi per ogni campione studiato, mentre essi non sono stati identificati dopo metanolisi alcalina. Gli  $\omega$ -idrossiacidi determinati nell'HA sono stati prevalentemente quelli a numero pari di carbonio (da C<sub>9</sub> a C<sub>26</sub>), con una prevalenza del C<sub>16</sub> e del C<sub>24</sub> (Figura 5.22). Le molecole a catena corta (C<sub>12</sub> – C<sub>16</sub>), generalmente correlate alla cutina, sono risultate ancora in maggiore quantità rispetto alle molecole a catena lunga suberiniche. (Naafs e van Bergen 2002; Santos Bento et al., 2001). Circa il 64% degli  $\omega$ -idrossiacidi è risultato costituito dall'acido  $\omega$ -idrossiesadecanoico.

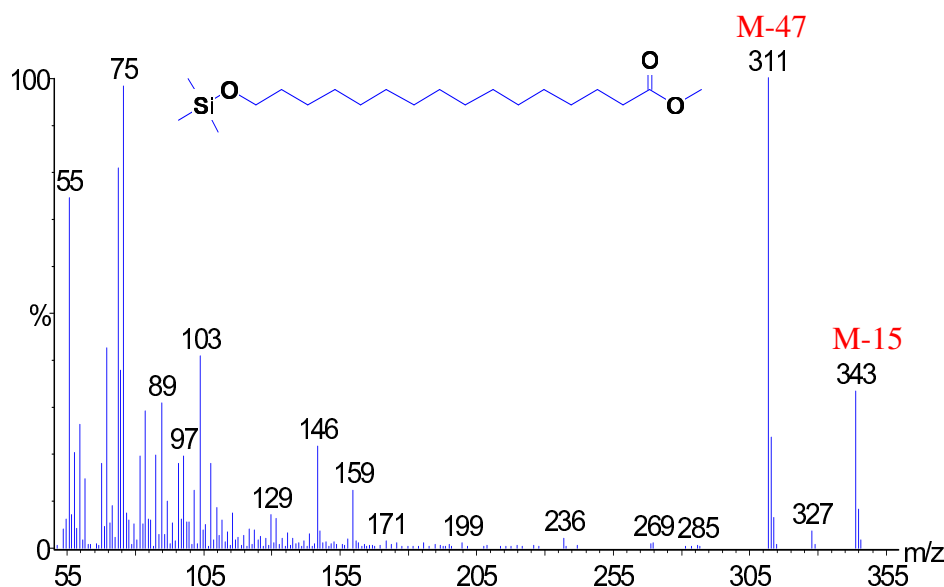
La frazione 1 presenta una distribuzione di omologhi simile all'HA, mentre la frazione 2 e la Frazione 3 non hanno prodotto la serie omologa completa ma solo l'omologo a 16 atomi di carbonio ed in quantità molto basse. Tra i di- e tri-idrossiacidi, l'acido 9,10-di-idrossi-octadecanoico è stato il più abbondante mentre non sono stati ritrovati composti a catena lunga, né tanto meno gli acidi  $\omega$ -idrossi esadecanoico ed octadecanoico con gruppo idrossilico o epossidico in posizione 2, i quali sono generalmente abbondanti tra i depolimerizzati delle suberine e tra i composti rilasciati per transesterificazione da materiali umici (Naafs e van Bergen 2002; Santos Bento et al., 2001)



**Figura 5. 22** Concentrazione (µg/g peso secco) degli idrossiacidi analizzati negli estratti organici dopo transesterificazione dei campioni umici: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2 D) Frazione 3

Generalmente, gli idrossiacidi sottoposti a metilazione e sililazione, presentano il gruppo idrossilico trimetilsililato e il gruppo carbossilico metilato. Gli spettri di massa dei prodotti di derivatizzazione degli ω-idrossiacidi hanno così mostrato picchi a m/z 75, 89 e 103, già osservati negli spettri degli alcoli alifatici, e che originano dalla

presenza del gruppo TMSiO in coda alla catena alifatica. Rispetto agli alcoli, essi mostrano in più un picco base a  $[M-47]^+$ , che deriva dalla perdita di un  $\text{CH}_3\text{OH}+\text{CH}_3$ . Lo ione molecolare non è ben visibile ma è possibile riconoscerlo dall'ampio picco a  $m/z$   $[M-15]^+$



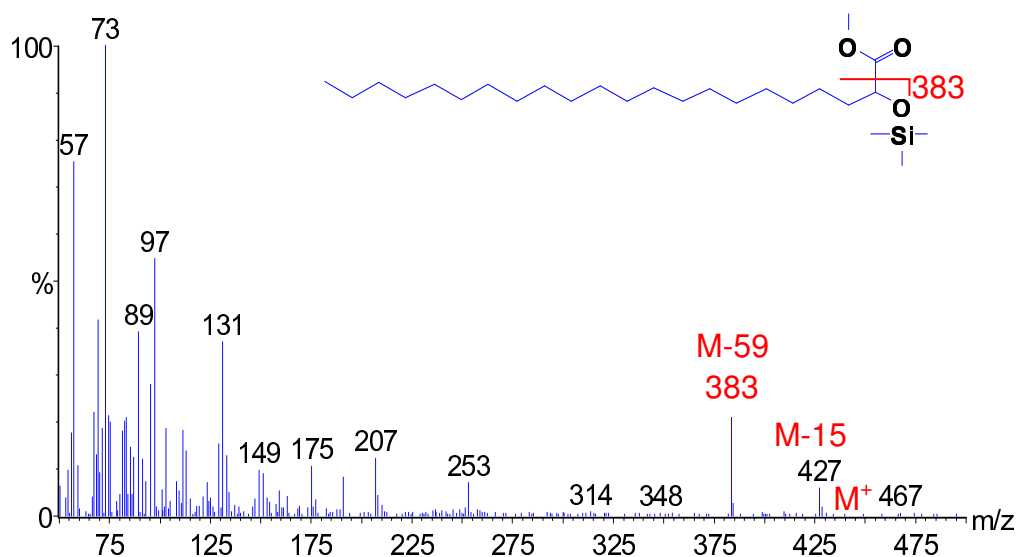
**Figura 5. 23** Spettro di massa dell'acido 16-O-(trimetilsilil)-esadecanoico metil estere

Altri acidi grassi idrossilati identificati sono risultati sostituiti in  $\alpha$  o  $\beta$ . Queste molecole sono tipici biomarker dell'attività batterica nella sostanza organica sottoposta a trasformazione biologica (Kawamura e Ishiwatari, 1982; Klok et al., 1988; Guignard et al., 2005). Esse vanno dal  $\text{C}_{10}$  al  $\text{C}_{26}$  con un massimo per i composti  $\text{C}_{16}$  e  $\text{C}_{18}$  nell'HA e nella Frazione 1, mentre più abbondanti sono il  $\text{C}_{18}$  e il  $\text{C}_{14}$  nella Frazione 2 e 3, rispettivamente.

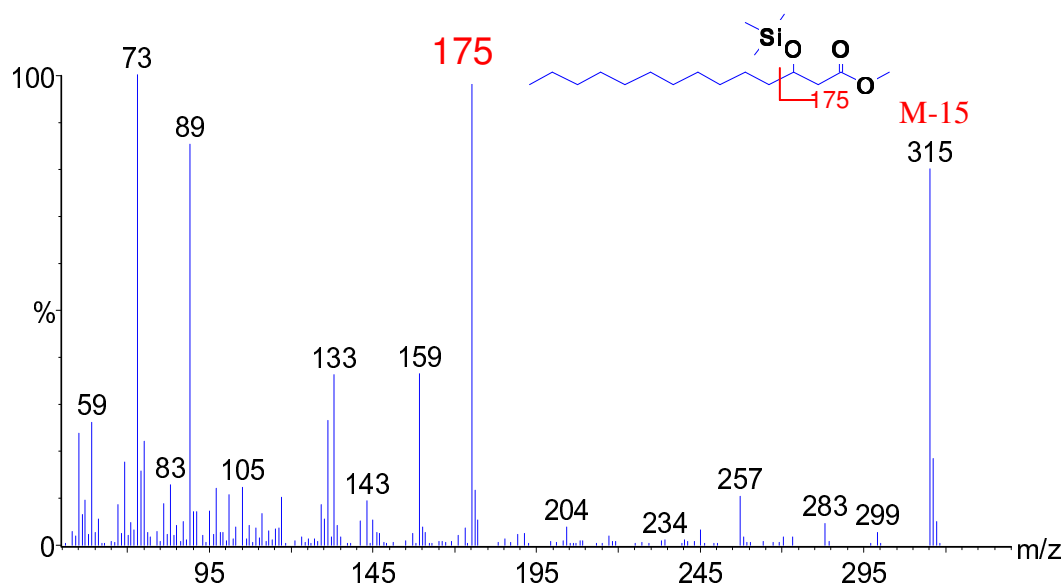
In Figura 5.24 è riportato lo spettro di massa dell'acido 2-O-(trimetilsilil)-docosanoico metil estere, dopo derivatizzazione a trimetilsililetere. Lo ione molecolare



non è molto abbondante ed è preceduto da uno ione a  $m/z$  427 che rappresenta la perdita di un metile dal gruppo trimetilsililetere. Il picco intenso a  $m/z$   $[M-59]^+$  (383 nel caso mostrato in Figura 5.24) può essere il risultato della rottura tra i carboni 1 e 2.



**Figura 5. 24:** Spettro di massa dell'acido 2-O-(trimetilsilil)-docosanoico metil estere.



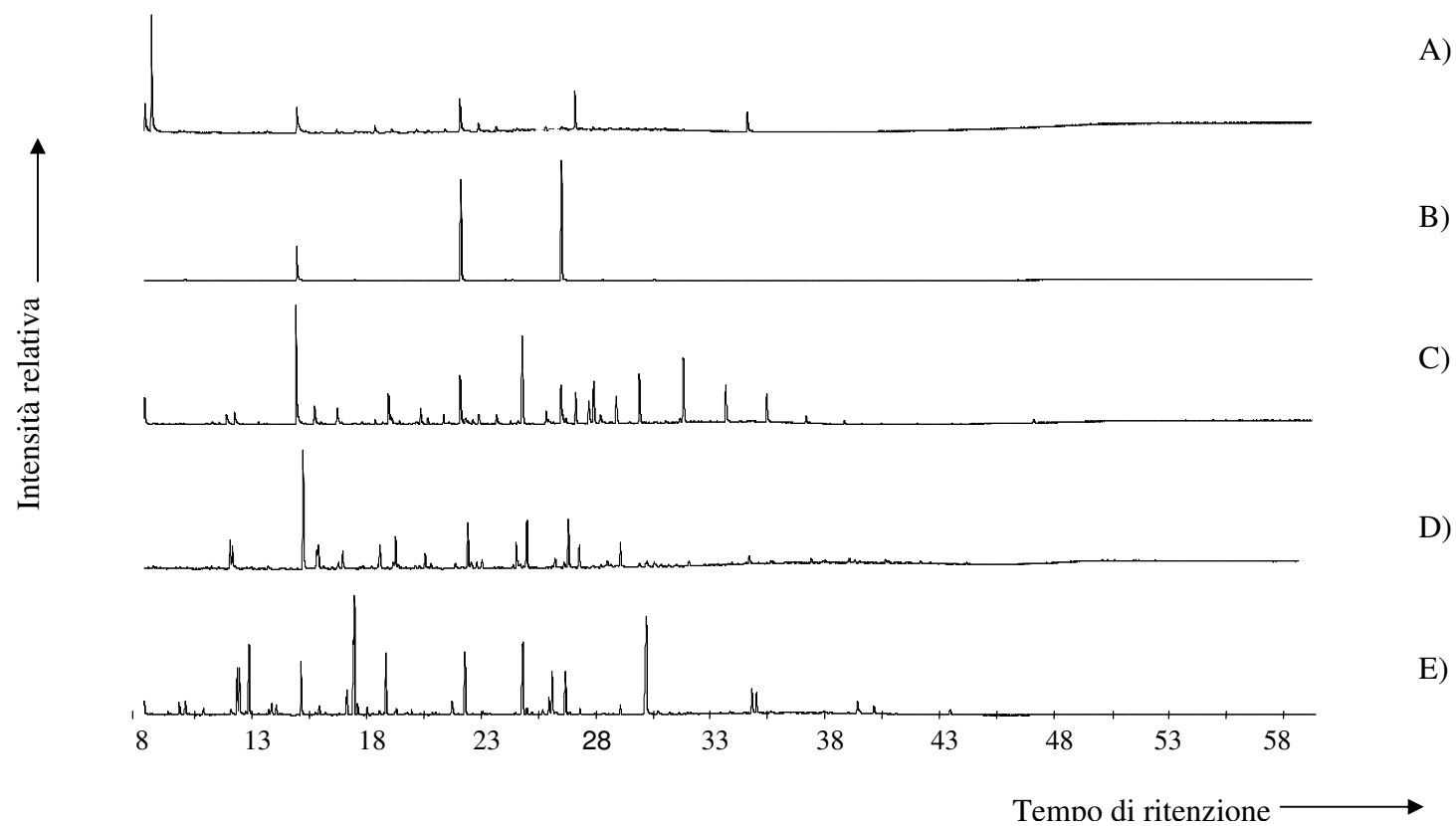
**Figura 5.25:** Spettro di massa dell'acido 3-O-trimetilsilil-tetradecanoico metal estere.

Anche lo spettro di massa dell'acido metiltetradecanoato 3-O-TMS etere derivato, presenta uno ione molecolare poco abbondante (Figura 5.25), ma il picco base a  $m/z$  315 corrispondente allo ione  $[M-15]^+$  permette l'identificazione della lunghezza della catena. La posizione del gruppo idrossilico inoltre può essere riconosciuta dallo ione  $m/z$  175.

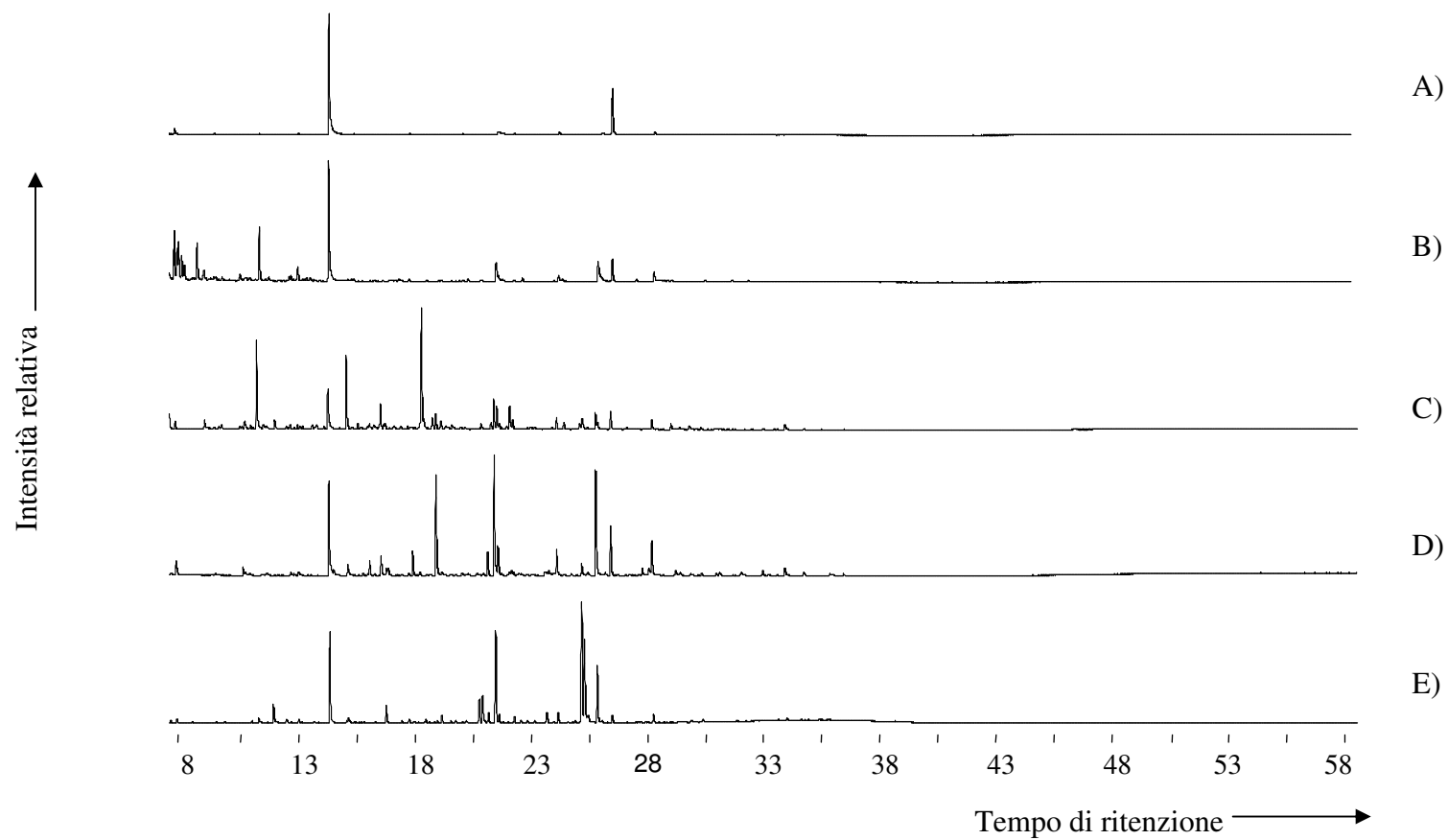
## 5.4 Conclusioni

Il lavoro di questa tesi è il primo che presenti dei dati quantitativi sulla composizione chimica di frazioni umiche a diverso peso molecolare apparente. In questo lavoro abbiamo constatato che le rese di estrazione sono maggiori per le frazioni umiche separate per esclusione molecolare, di quelle ottenute dell'HA iniziale. Questo importante risultato può essere spiegato con due principali motivi: 1. una migliore rilevazione per spettrometria di massa dovuta alla maggiore omogeneità delle frazioni HPSEC; 2. una semplificazione delle strutture conformazionali delle frazioni separate tali da influire notevolmente sulla capacità estrattiva del frazionamento sequenziale adottato. Infatti, le procedure impiegate (estrazione in solventi, transesterificazione, metanolisi) hanno permesso di raggiungere delle componenti molecolari nelle frazioni separate che non potevano essere raggiunte nell'HA originale per le forti associazioni intermolecolari che le tenevano strettamente legate.

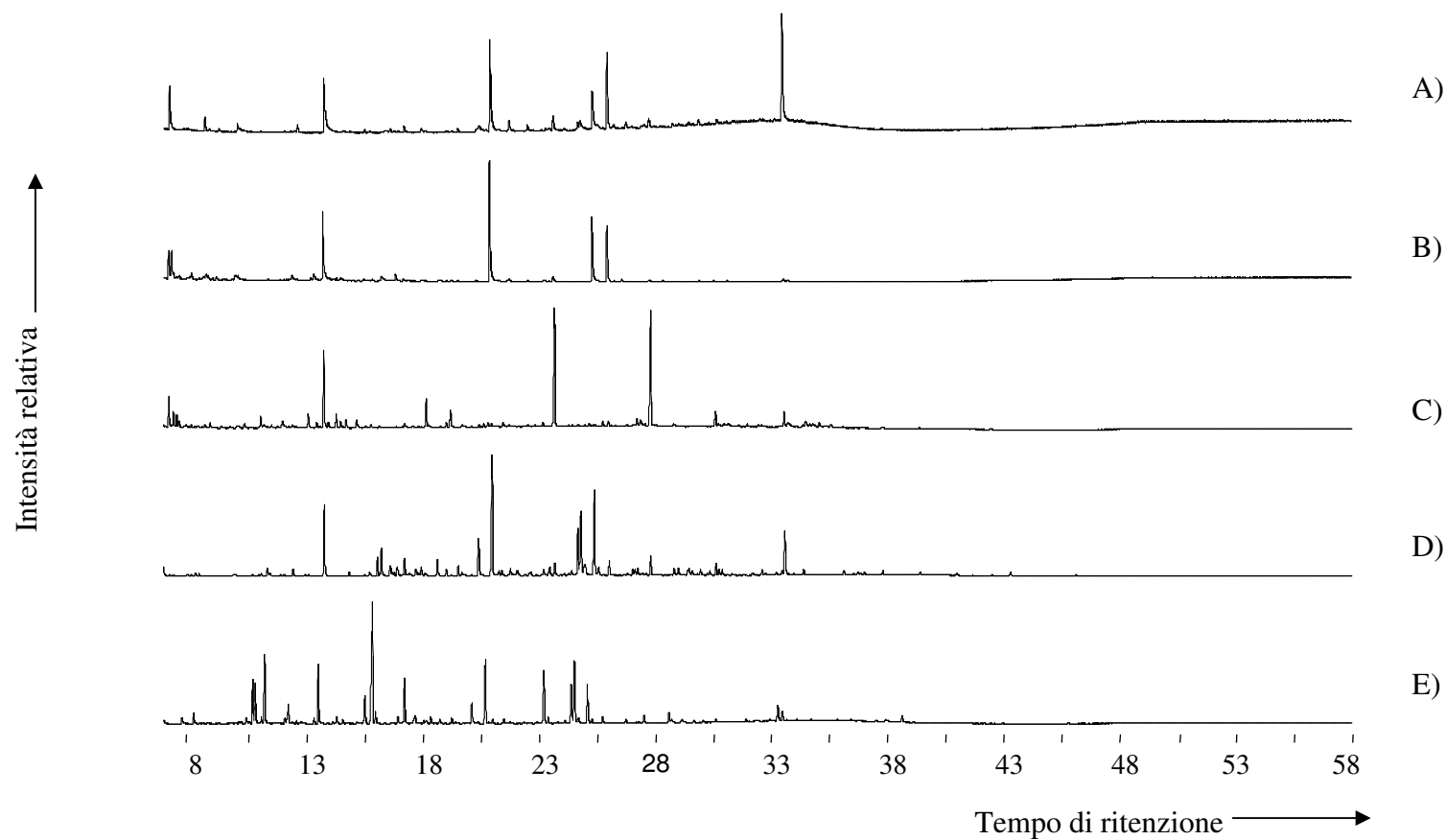
Sebbene la maggior parte dei composti identificati siano presenti in ogni campione studiato, la loro distribuzione relativa varia nelle frazioni separate e varia in funzione dei trattamenti ricevuti dai campioni umici nel corso del frazionamento sequenziale. I risultati indicano che vi sono differenze tra le frazioni non solo per la quantità netta di ciascuna classe di composti, ma anche per la forza di interazione delle classi di composti con la matrice umica.



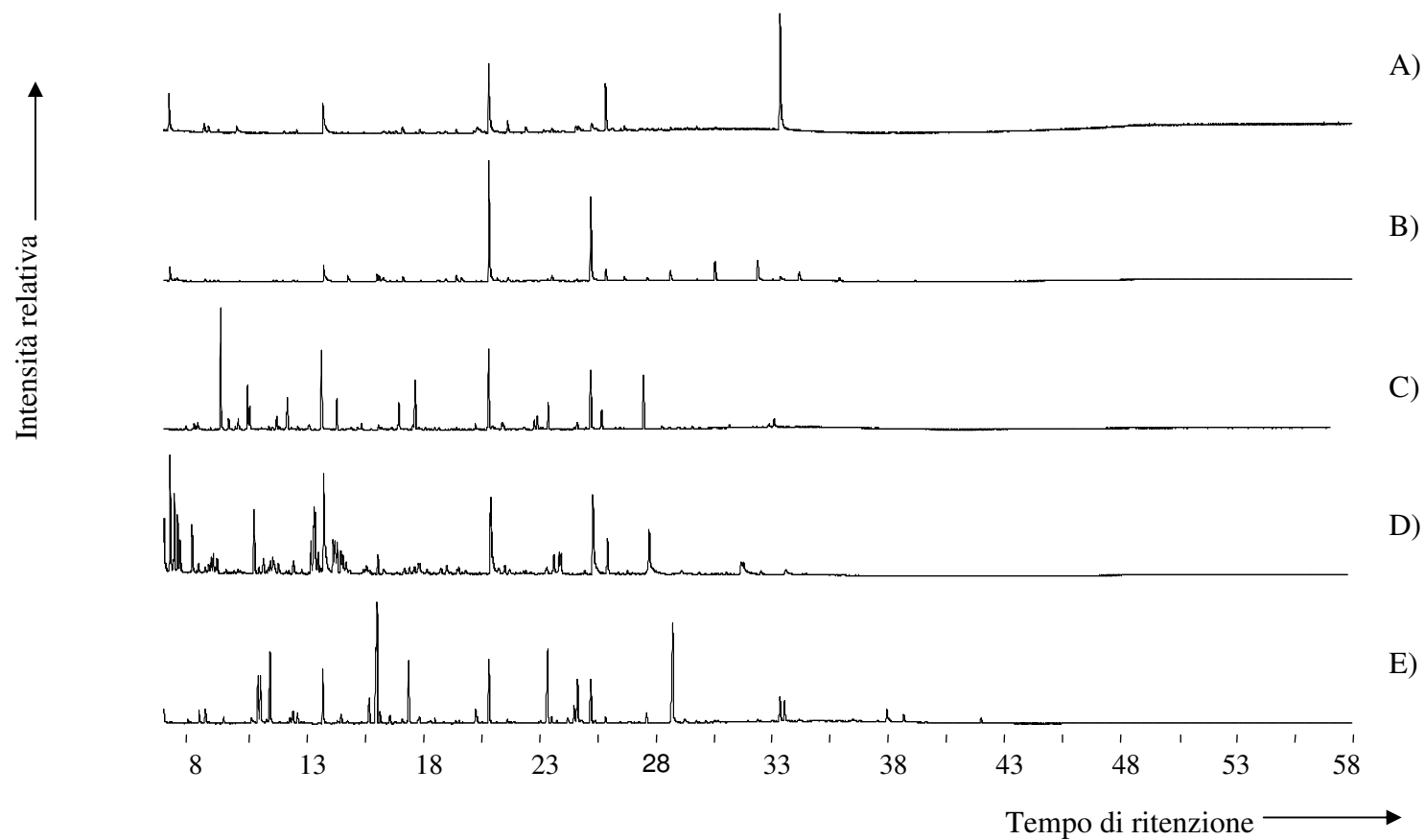
**Figura 5.26** Cromatogrammi ottenuti dagli estratti organici dell'HA: A) Frazione neutra delle componenti libere B) Frazione acida delle componenti libere, C) Frazione neutra delle componenti debolmente legate alla matrice umica D) Frazione acida delle componenti debolmente legate E) Componente fortemente legata alla matrice umica.



**Figura 5.27** Cromatogrammi ottenuti dagli estratti organici della Frazione 1: A) Frazione neutra delle componenti libere B) Frazione acida delle componenti libere, C) Frazione neutra delle componenti debolmente legate alla matrice umica D) Frazione acida delle componenti debolmente legate E) Componente fortemente legata alla matrice umica



**Figura 5.28** Cromatogrammi ottenuti dagli estratti organici della Frazione 2: A) Frazione neutra delle componenti libere B) Frazione acida delle componenti libere, C) Frazione neutra delle componenti debolmente legate alla matrice umica D) Frazione acida delle componenti debolmente legate E) Componente fortemente legata alla matrice umica.



**Figura 5.29** Cromatogrammi ottenuti dagli estratti organici della Frazione 3: A) Frazione neutra delle componenti libere B) Frazione acida delle componenti libere, C) Frazione neutra delle componenti debolmente legate alla matrice umica D) Frazione acida delle componenti debolmente legate E) Componente fortemente legata alla matrice umica.

## CAPITOLO 6

### TERMOCHEMOLISI-GC/MS DEI CAMPIONI UMICI

#### 6.1 Introduzione

La termochemolisi delle HS in presenza di TMAH rilascia un elevato numero di molecole che sono identificate per GC/MS come metil esteri e metil eteri di composti naturali. Tuttavia, la reazione di metilazione mediante TMAH è anche una reazione di transesterificazione. Per questo non è possibile distinguere tra gruppi impegnati in legami esterei e gruppi liberi. Il tetraetilammonio (TEAH), invece, è un agente alchilante meno reattivo, per cui solo i gruppi liberi vengono derivatizzati e, inoltre, l'etilazione permette di distinguere tra gruppi metilici preesistenti e gruppi etilati dal reagente (Götz e Fakoussa, 1999). In questo capitolo si riporta lo studio sull'HA e sulle sue frazioni separate effettuato con la termochemolisi eseguita "in linea" alla GC/MS utilizzando come reagente sia il TMAH sia il TEAH. Le informazioni ottenute da questo studio sono qualitativamente confrontate con quelle ottenute dal frazionamento sequenziale.

#### 6.2 Pirolisi "in-linea" alla GC-MS delle sostanze umiche in presenza di TMAH

I cromatogrammi ottenuti dalla termochemolisi dell'HA e delle frazioni HPSEC, sono mostrati in Figura 6.1, mentre le abbondanze relative, gli intervalli dimensionali e gli omologhi dominanti delle maggiori classi di composti sono riportati in Tabella 6.1.

Alla fine del capitolo invece si riporta una Tabella (Tabella 6.5) con tutti i composti individuati ed i relativi tempi di ritenzione.

Le maggiori classi di composti identificati sono nell'ordine: aromatici, acidi grassi, derivati delle proteine, idrocarburi, derivati dei carboidrati, steroidi e terpenoidi.

### 6.2.1 Composti aromatici

I composti aromatici rappresentano la più ampia classe di composti rilasciati dalle termochemolisi con TMAH. Tuttavia, non tutti i prodotti identificati mediante GC/MS sono indicativi delle componenti originali, ma possono essere il prodotto di reazioni secondarie e di artefatti.

**Tabella 6.1** Abbondanza relativa (%) e composizione<sup>a</sup> dei maggiori prodotti di termochemolisi rilasciati dall'HA e dalle frazioni HPSEC.

Componenti	HA	Frazione 1	Frazione 2	Frazione 3
p-idrossifenile (P)	19.82(±2.46)	8.81 (±2.98)	7.37(±0.68)	4.46(±0.24)
Guaiacolo (G)	15.17(±1.42)	8.16 (±1.61)	10.67(±1.85)	6.66(±0.37)
Siringolo (S)	5.68(±1.47)	2.25(±0.44)	3.14(±0.72)	1.57(±0.58)
Acidi cinnamici	3.28(±0.98)	1.96(±0.88)	2.92(±0.59)	1.38(±0.72)
Aromatici condensati	0.28 (±0.1)	1.6(±0.4)	0.17(±0.03)	1.24(±0.47)
Altri aromatici	12.37(±2.01)	14.33(±4.61)	7.17(±4.79)	15.01(±4.95)
Acidi grassi saturi	10.46(±1.81) C <sub>13</sub> -C <sub>31</sub> (C <sub>16</sub> )	11.07(±1.83) C <sub>9</sub> - C <sub>31</sub> (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> )	26.77(±2.47) C <sub>10</sub> ,C <sub>28</sub> (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> )	17.66(±3.03) C <sub>30</sub> -C <sub>31</sub> (C <sub>16</sub> )
Acidi grassi insaturi	2.23(±0.33) C <sub>9</sub> ,C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	1.3(±0.43) C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	12.08 (±3.22) C <sub>7</sub> ,C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	1.09(±0.43) C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>
Alcani/alcheni	6.21(±3.15) C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )	16.21(±5.41) C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )	9.04(±1.77) C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )	21.02(±2.73) C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )
Acidi α,ω-alcandioici	1.46(±0.32) C <sub>5</sub> -C <sub>11</sub> (C <sub>9</sub> )	3.13(±0.47) C <sub>5</sub> -C <sub>9</sub> (C <sub>9</sub> )	4.59(±0.56) C <sub>6</sub> -C <sub>22</sub> (C <sub>16</sub> )	2.56(±1.16) C <sub>6</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>6</sub> )
Steroidi	0.62(±0.06)	0.19(±0.02)	0.23(±0.6)	0.02(±0.01)
Terpenoidi	0.33(±0.12)	0	0.36(±0.02)	0
Derivati delle proteine	15.24 (±0.96)	21.8(±0.24)	16.3(±1.77)	14.25(±1.62)
Derivati dei carboidrati	6.62 (±2.22)	9.20(±2.68)	4.91(±2.67)	11.01(±1.11)

a. Intervallo che va da C<sub>i</sub> a C<sub>j</sub>; in parentesi sono riportati gli omologhi dominanti.

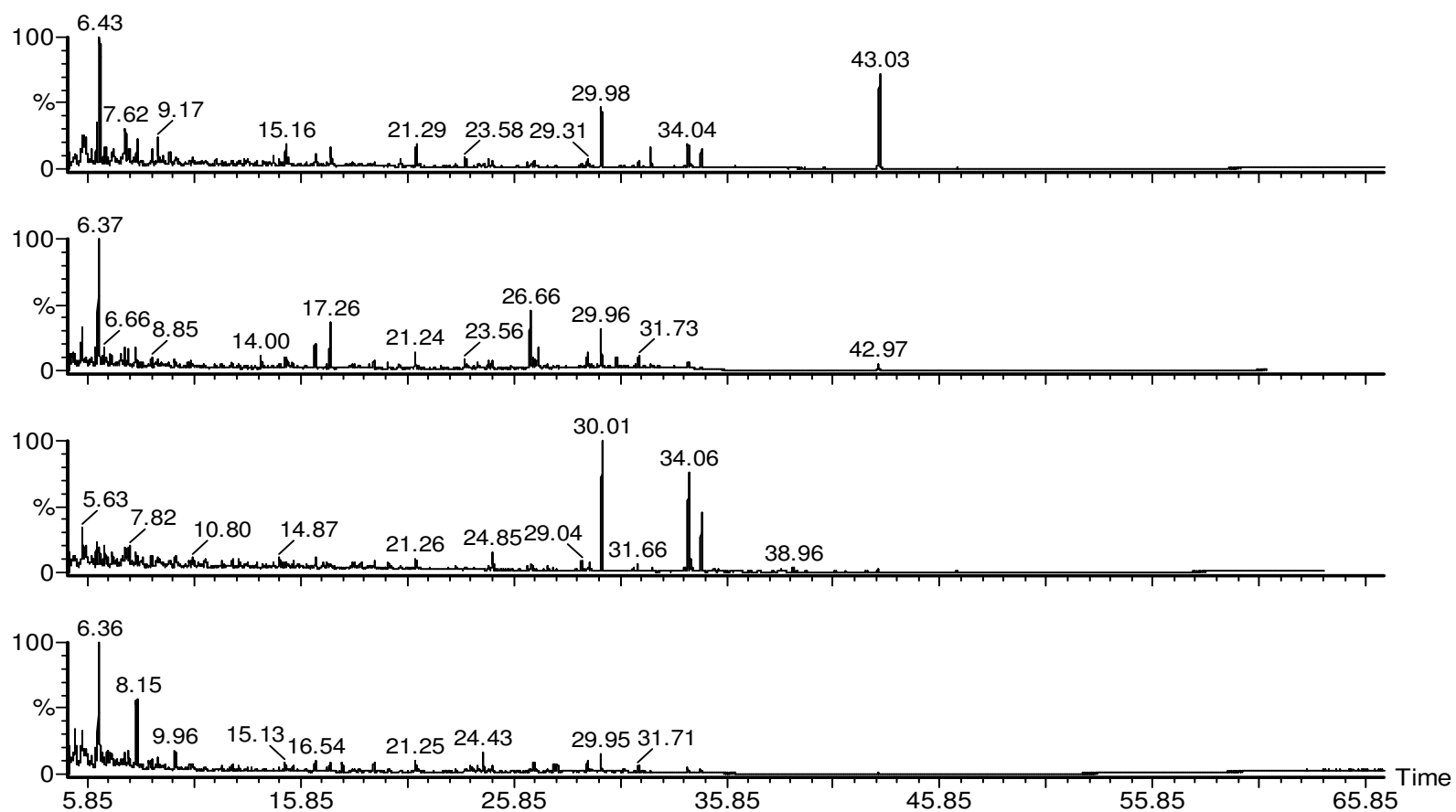


Comunque, differenti composti identificati possono essere derivati dalla lignina e sono associati in Tabella 6.3 al corrente simbolismo utilizzato nelle analisi di termochemolisi per le strutture di base della lignina: **P.** idrossifenile, **G.** guaiacolo (3-metossi, 4-idrossifenile), e, **S.** siringolo (3,5-dimetossi, 4-idrossifenile ) (Vane et al., 2001; Hatcher et al., 1995).

Le maggiori componenti derivate dalla lignina rilasciate dall'HA sono i rispettivi prodotti ossidati, sia del di-, sia del tri-metossifenilpropano, come la benzaldeide (G4 e S4), l'acetofenone (G5 e S5) e l'acido benzoico (G6 e S6). Altri classici prodotti di termochemolisi della lignina, come i *cis* e *trans* isomeri del 1-(3,4-dimetossifenil)-2-metossietilene (G7 e G8) e l'1-(3,4,5-trimetossifenile)-2-metossietilene (S7 e S8), oltre agli enantiomeri dell'1-(3,4-dimetossifenile)-1,2,3-trimetossipropano (G14 e G15) e l'1-(3,4,5-trimetossifenile)-1,2,3-trimetossipropano (S14 e S15), sono stati identificati in basse quantità. L'acido 3-(4-metossifenile)-2-propenoico (P18) e l'acido 3,4-dimetossifenile-2-propenoico (G18) possono derivare sia dall'ossidazione delle unità p-idrossifeniliche e guaiaciliche della lignina, sia dai domini aromatici della suberina. Perciò essi sono inclusi in Tabella sia tra i derivati della lignina, sia tra gli acidi cinnamici.

L'HA è più ricco di derivati della lignina rispetto alle frazioni HPSEC. Tra queste ultime la più ricca di unità guaiaciliche, siringiliche e cinnamiche è risultata la Frazione 2 (10.67%, 8.16% e 2.92%) seguita, in ordine, dalla Frazione 1 (8.16%, 2.25% e 1.96%) e dalla Frazione 3 (6.66%, 1.57% e 1.38%). Le unità p-idrossifeniliche sono risultate più abbondanti nella Frazione 1 (8.81%), rispetto alla Frazione 2 (7.37%), e alla Frazione 3 (4.46%). Altri prodotti aromatici rilasciati dalla termochemolisi sono

fenoli, metilfenoli, toluene, e alchil benzeni che costituiscono una larga parte dei composti rilasciati da ciascun campione unico. Tuttavia non è possibile attribuirli ad un'unica fonte ma possono avere più origini (polisaccaridi, proteine, lignina). Inoltre, essi possono essere anche il prodotto di reazioni secondarie.



**Figura 6.1** Cromatogrammi ottenuti da prodotti di termochemolisi con TMAH di: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3.

Saiz-Jimenez (1994), infatti, riporta che la pirolisi classica degli acidi grassi insaturi, in presenza di zolfo elementare, può presentare prodotti come alchilbenzeni ed alchiltiofeni. Così, questi composti ciclici alchilati possono essere sia prodotti di evaporazione/pirolisi dalla matrice umica, sia artefatti (Saiz-Jimenez, 1994). Sebbene nello stesso lavoro l'autore riporti che la pirolisi in presenza di tetrametilammonio riduca considerevolmente questi prodotti, non si può escludere che i composti alchilbenzenici rilasciati indichino la presenza di acidi grassi insaturi piuttosto che di composti aromatici. Infatti, è comunque possibile produrre alchilbenzeni e alchiltiofeni per incompleta metilazione degli acidi insaturi a causa di una quantità insufficiente di tetrametilammonio o per competizione con lo zolfo elementare..

Sono anche identificate piccole quantità di composti aromatici come naftalene, fluorene, antracene, bifenili etc.. Questi composti derivano dalla incompleta combustione delle biomasse e rappresentano una componente importante della Frazione molecolare refrattaria della sostanza organica. Il picco a 130 ppm negli spettri NMR può indicare la presenza di molecole aromatiche condensate e, come già riportato da Naafs (2004), anche nel presente lavoro questo materiale potrebbe quindi essere sottostimato dalla termochemolisi.

### 6.2.2 *Composti alchilici*

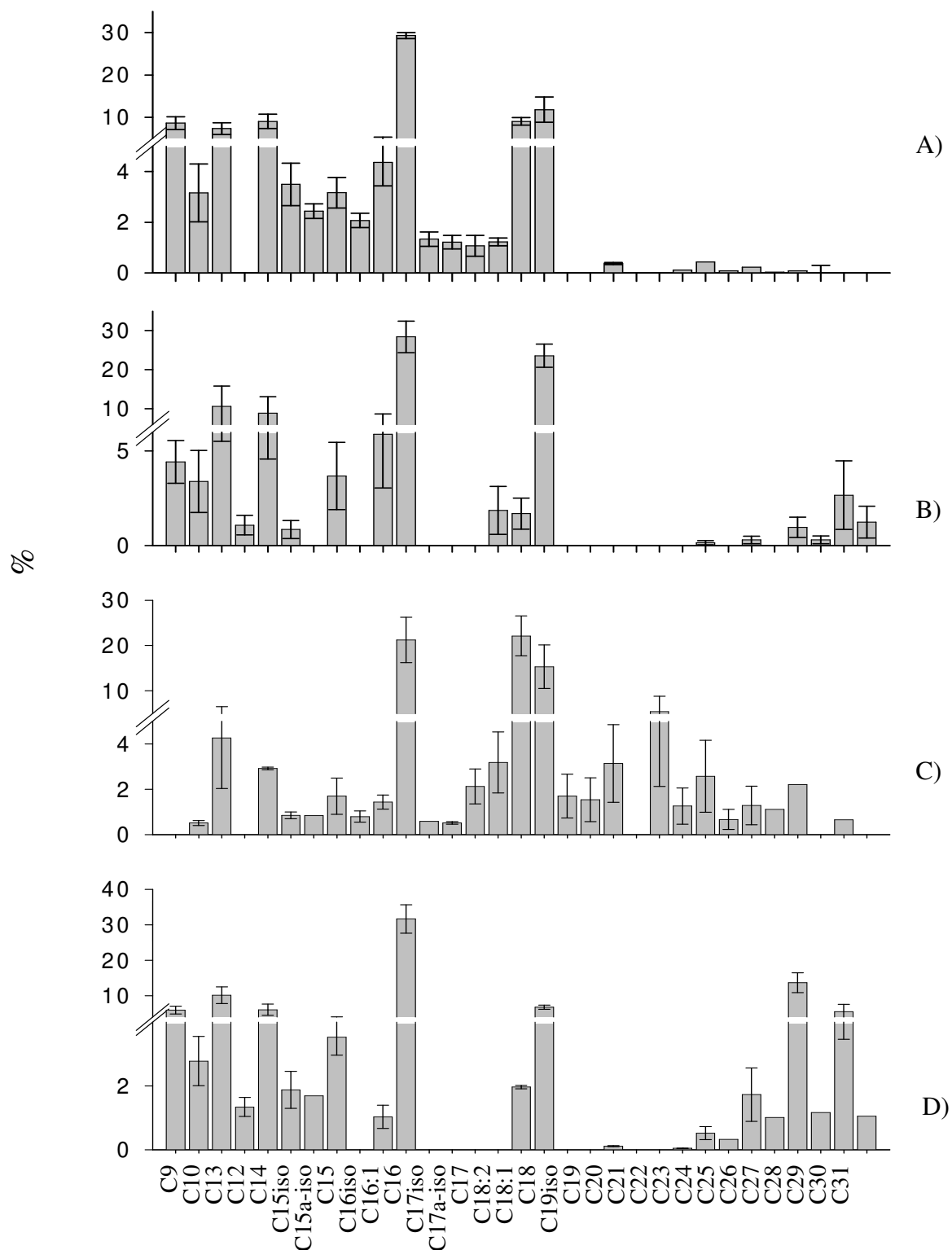
I risultati ottenuti con la termochemolisi-GC-MS suggeriscono che la Frazione 2 è la più ricca in acidi carbossilici. La Frazione 2, infatti, rilascia maggiormente metil esteri di acidi alifatici (38.85 %), con catene che vanno dal C<sub>10</sub> al C<sub>30</sub>. Circa il 64% degli acidi grassi metilati identificati nella Frazione 2 sono costituiti dagli acidi esadecanoici ed octadecanoici, sia saturi che insaturi, i quali sono componenti ubiquitarie negli

organismi viventi e nell'ambiente. L'HA, la Frazione 1 e la Frazione 3 sono meno ricche di acidi grassi, contenendone 12.69 %, 12.37 % e 18.75 %, rispettivamente. Queste frazioni non presentano un grande contenuto di acidi insaturi (2.23%, 1.3% e 1.09%), mentre la Frazione 2 è formata al 12.08% di acidi grassi insaturi, in accordo con quanto è stato già dimostrato per il frazionamento sequenziale. Anche in accordo con il frazionamento sequenziale, appare il diretto input dall'attività microbica, come è rilevato dall'identificazione degli acidi alifatici ramificati (*iso* e *anteiso* C<sub>15</sub> e C<sub>17</sub>).

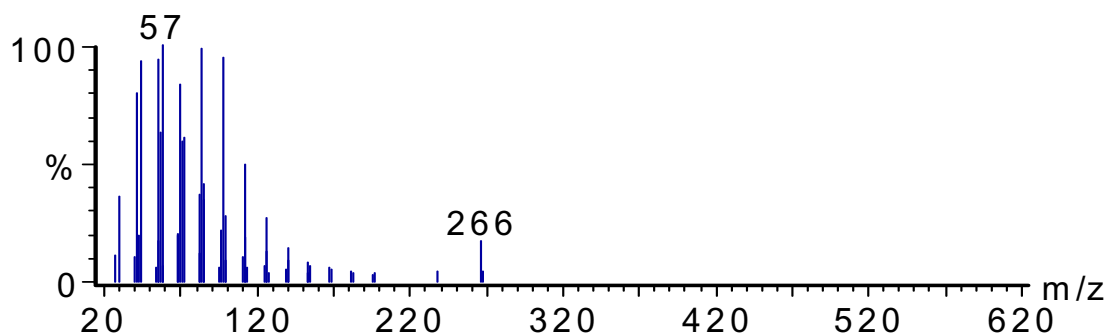
Nei pirogrammi di tutte le sostanze umiche studiate sono identificabili i caratteristici doppi picchi di *n*-alcheni/*n*-alcani nell'intervallo C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>, mentre solo idrocarburi saturi sono identificabili nell'intervallo C<sub>25</sub>-C<sub>31</sub>. La prevalenza degli omologhi dispari rispetto a quelli con numero di carboni pari, suggerisce una prevalente origine degli alcani dalle cere dei vegetali superiori. (Lichtfouse, 1998).

Gli spettri degli alcani sono già stati presentati e discussi nel capitolo 5. Qui riportiamo lo spettro di massa di un alchene (Figura 6.3). Gli spettri di questa classe di composti presentano uno ione base dovuto a rottura alchilica con la carica portata dal frammento con doppio legame. I picchi caratteristici sono a m/z 55, 69, 83, 97.

Una significativa percentuale di idrocarburi sono rilasciati dalla Frazione 1 e dalla Frazione 2 (16.21 % e 21.02%), mentre quantità inferiori sono rilasciate dall'HA e dalla Frazione 3. (6.21% and 9.04%). In letteratura è riportato che i doppi picchi di alcheni/alcani sono indicativi della presenza nei campioni di biopolimeri alifatici resistenti (cutina, suberina, ecc) (Tegelaar et al., 1989; van Bergen et al., 1997; Augris et al., 1998; Gobè et al., 2000; Bruan et al., 2001). Gli *n*-alcani/*n*-alch-1-eni possono



**Figura 6.2** Abbondanza relativa (%) degli acidi alcanoici rilasciati dalla termochemolisi con TMAH di: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3



**Figura 6.3** Spettro di massa del nonadecene

anche essere formati tramite termochemolisi per la incompleta metilazione e decarbossilazione degli acidi grassi, e/o deidratazione degli alcoli (van de Meent et al., 1980). Questi ultimi non sono stati identificati nei pirogrammi degli estratti organici derivanti dal frazionamento sequenziale. Tuttavia, la distribuzione di alcoli rilasciati da frazionamento sequenziale e quella di acidi alcanoici rilasciati da entrambe le tecniche, è differente dalla distribuzione degli *n*-alcheni/*n*-alcani, suggerendo perciò che alcoli e acidi grassi non siano la fonte principale degli idrocarburi identificati. Anche diterpeni triciclici e triterpeni tetra e pentaciclici sono stati distintamente identificati, sebbene in basse quantità, tra i prodotti di termochemolisi ottenuti dall'HA e dalle frazioni HPSEC. I composti identificati sono gli stessi già mostrati nel capitolo 4.

### 6.2.3 Carboidrati.

Alcuni picchi nei cromatogrammi ottenuti per termochemolisi sono stati assegnati a piccoli prodotti attribuibili a carboidrati, come ciclopentenoni, furaldeidi,

furani e metossibenzeni isomeri (Challinor, 2001) Invece, non sono stati individuati gli acidi saccarinici (Fabbri e Helleur, 1999), che sono stati invece identificati durante il frazionamento sequenziale. Tuttavia, Fabbri e Helleur, (1999) avevano identificato questi composti per pirolisi fuori-linea ed usando TMAH in acqua, condizioni molto diverse da quelle usate in questa tesi. L'abbondanza relativa dei carboidrati nelle frazioni HPSEC ottenuta per termochemolisi, in accordo con quanto osservato negli spettri NMR e per frazionamento sequenziale, indica che la Frazione a più basso peso molecolare presenta la più alta quantità di carboidrati.

#### *6.2.4 Composti contenenti azoto e zolfo*

Prodotti contenenti azoto come indoli, pirroli, benzendiammine, imidazoli etc. sono presenti in grande quantità nei pirolizzati dei campioni umici studiati. Tuttavia, la presenza di composti eterociclici nei pirolizzati degli acidi umici non è un prova esclusiva del contenuto di N eterociclico, in quanto questi composti possono anche derivare da reazioni secondarie a partire da amminoacidi (Chiavari e Galletti, 1992; Saiz-Jimenez, 1996).

In effetti, la prevalenza dell'azoto nella forma ammidica o nella forma eterociclica nelle sostanze umiche, è una questione di particolare interesse per la comprensione della composizione chimica della sostanza organica (Schulten e Schnitzer, 1998; Schmidt, 1997; Knicker e Ludemann, 1995; Knicker, 2000; Mahieu., 2000; Zang, 2000; Kelemen, 2002; Smernik e Baldock, 2005; Knicker, 2002; Schmidt-Rohr, 2004; Knicker, 2001; Abe e Watanabe 2004; Vairavamurthy e Wang, 2002; Myneni, 2002 ), in quanto la presenza nelle sostanze umiche d'azoto prevalentemente in forma ammidica, verificata con numerose tecniche, indica che i gruppi ammidici non



sono progressivamente eliminati e trasformati in azoto eterociclico durante la formazione delle macromolecole umiche, come postulato dal modello “polimerico”. Alla luce dei lavori riportati in letteratura, sembra che l’azoto ammidico dei peptidi sia la forma chimica dominante nelle sostanze umiche (Sutton e Sposito, 2005). Comunque gli N-composti possono essere anche il prodotto di trasformazioni secondarie che si verificano durante la termochemolisi dovute al TMAH (Nierop et al., 2001; Zang et al., 2001 ; Fabbri et al, 1996).

I risultati presentati in questo capitolo concordano con quanto riportato in letteratura. Dall’analisi GC/MS degli estratti organici ottenuti dal frazionamento sequenziale (capitolo 5), non si sono identificati né composti eterociclici né composti ammidici. L’azoto presente negli amminoacidi e nei peptidi, può non essere derivatizzato per la competizione degli altri gruppi funzionali, e quindi l’azoto ammidico non è individuato per GC/MS. Se fossero presenti composti azotati eterociclici, si sarebbero dovuti facilmente identificare nei cromatogrammi GC/MS degli estratti organici, in quanto composti sufficientemente volatili. Poiché i composti di N eterociclico sono rilasciati solo dopo termochemolisi, essi devono quindi essere prodotti di ciclizzazione derivanti da composti contenenti azoto ammidico.

Gli N-composti rappresentano una Frazione molto importante dei prodotti di termochemolisi (Tabella 6.1) e la loro importanza relativa sembra essere confermata dai dati ottenuti dalla CPMAS  $^{13}\text{C}$  NMR (Tabella 4.2), relativi all’intervallo di risonanza dei carboni C-N. Questi risultati sembrano in buon accordo anche con l’analisi elementare. La Frazione 1 ha il più ricco contenuto di N-composti seguita in ordine dalla Frazione 2, dall’HA e dalla Frazione 3.

Infine, sono stati identificati quantità esigue di composti contenenti zolfo come tiofene, 2-metiltiofene. Questi composti sono stati precedentemente riportati da Saiz-Jimenez e de Leeuw (1986) nelle frazioni fulviche ed umiche di un suolo. La flebile quantità di questi composti riflette il basso contenuto di zolfo nelle sostanze umiche. Inoltre, i prodotti solforati possono essere degli artefatti dovuti alla presenza di zolfo elementare, come già discusso nel caso degli alchilbenzeni.

### 6.3 Termochemolisi con tetraetilammonio (TEAH)

I pirogrammi ottenuti con la termochemolisi in presenza di TEAH sono riportati in Figura 6.7 mentre in Tabella 6.2 sono riportate le percentuali relative alle maggiori classi di composti identificate, gli intervalli dimensionali e gli omologhi dominanti. I singoli composti invece sono elencati nella Tabella 6.6 riportata alla fine del capitolo. Si può subito notare che i pirogrammi ottenuti con questa tecnica presentano meno segnali di quelli ottenuti mediante termochemolisi con TMAH, a conferma della minore reattività dell'agente alchilante utilizzato.

Tabella 6.2 Abbondanza relativa (%) e composizione<sup>a</sup> dei maggiori prodotti di termochemolisi con TEAH rilasciati dall'HA e dalle sue frazioni HPSEC.

<b>Composti</b>	<b>HA</b>	<b>Frazione 1</b>	<b>Frazione 2</b>	<b>Frazione 3</b>
Derivati della lignina	3.0	2.3	1.8	2.1
Altri aromatici	47.0	44.0	42.0	43.0
Acidi grassi saturi	4.4	4.1	4.2	4.0
Alcani/alcheni	21.9	25.0	26.0	24.0
Derivati delle proteine	15.0	13.0	14.0	12.0
Derivati dei carboidrati	1.0	0.8	0.7	1.2

a. Intervallo che va da Ci a Cj; in parentesi sono riportati gli omologhi dominanti.

Inaspettatamente, è stata rilevata una notevole quantità di composti aromatici, i quali, tuttavia, non possono essere attribuiti ad una specifica fonte, ma, probabilmente, a prodotti di reazioni secondarie e di degradazione termica. In effetti la minore efficacia del TEAH nell'alchilare le molecole polari, rende le condizioni di pirolisi in presenza di questo reattivo, più simili alla pirolisi classica che ad una termochemolisi vera e propria. Perciò sono presenti molti prodotti di degradazione termica e di reazioni secondarie, non riconducibili alle molecole originali presenti nei campioni umici.

Il secondo gruppo di composti identificati in ordine di importanza sono gli alcani e gli alcheni. Queste molecole estremamente volatili sono identificabili per GC/MS senza derivatizzazione. Inoltre possono essere il prodotto della degradazione termica di altre molecole alifatiche come gli alcoli e gli acidi. Oltre a questi prodotti, si ritrovano quantità minori di molecole che hanno reagito col TEAH e quindi si presentano etilate.

Gli acidi grassi saturi, lineari e ramificati, rappresentano una importante percentuale dei composti etilati identificati, a conferma che una quantità importante di queste molecole è presente nelle sostanze umiche in forma libera. Gli acidi grassi insaturi invece non sono stati identificati.

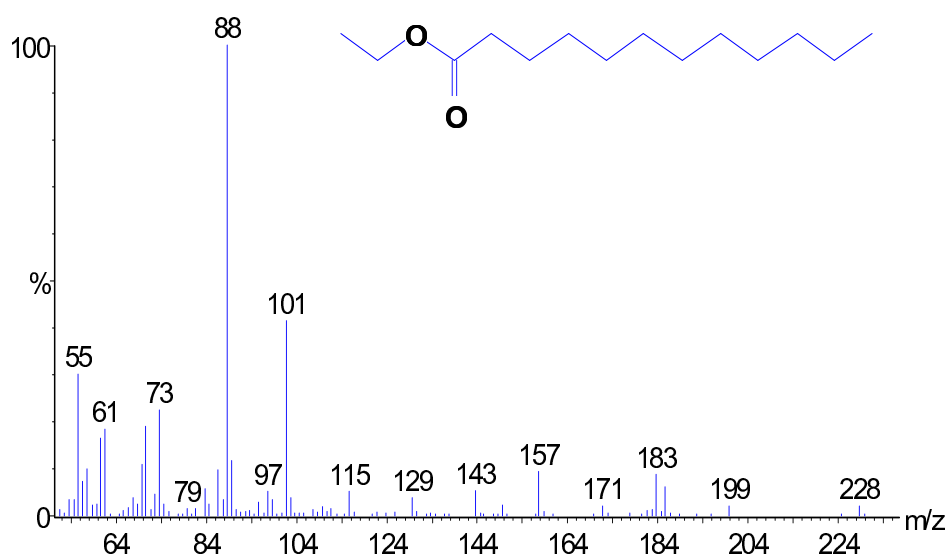
Rispetto alla termochemolisi con TMAH, sono stati identificati minori quantità di composti derivanti dalla lignina, a conferma che questi composti sono maggiormente impegnati in legami esterei. Inoltre sono identificate solo unità p-idrossifenoliche, mentre non sono state ritrovate unità G ed S. Una piccola quantità di composti aromatici condensati, come il fluorene, il naftalene e il fenalene, sono stati anche identificati dopo etilazione termochemolitica

Un'ampia varietà di segnali sono derivati da prodotti secondari del tetraetilammonio (triethylammina; 1,2-etandiammina, N,N,N'-triethyl-ecc.), mentre alcuni

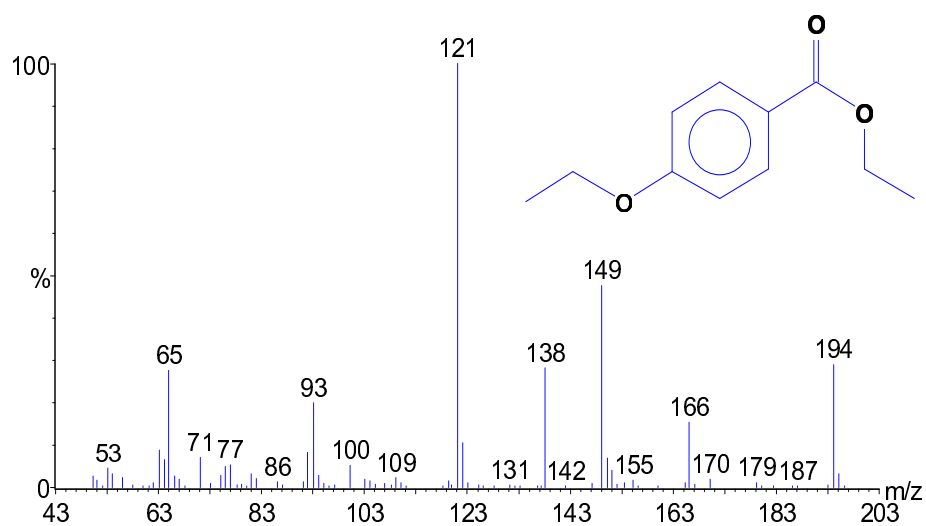
dei picchi ottenuti nei pirogrammi possono essere attribuiti a prodotti azotati generalmente riconducibili ad amminoacidi o peptidi, come già precedentemente descritto. La presenza, nella prima parte dei pirogrammi, di numerosi e larghi segnali dovuti al tetraetilammonio, ha reso poi difficile l'identificazione di altri prodotti che solitamente eluiscono agli stessi tempi di ritenzione, come, ad esempio, prodotti di degradazione dei carboidrati.

In Figura 6.4 riportiamo lo spettro di massa dell'acido tetradecanoico etil estere. Lo spettro rassomiglia a quello dei metil esteri, eccetto che lo ione derivante dal riarrangiamento di McLafferty è  $m/z$  88 invece che a  $m/z$  74. Inoltre nell'intervallo di masse alte vi è uno ione a  $[M-29]^+$ , dovuto alla perdita del gruppo etile, e poi lo ione a  $[M-43]^+$ , già discusso per i metil esteri.

In Figura 6.5 si riporta lo spettro di massa dell'acido 4-etossibenzoico etilestere. Lo ione molecolare, sebbene meno evidente rispetto ai metil esteri degli aromatici, è ancora ben visibile. Inoltre sono osservabili alcuni picchi caratteristici degli acidi aromatici etilati, quali lo ione  $[M-(R-H)]^+$  e lo ione  $[ArCOO]^{+•}$  che nello spettro riportato corrispondono rispettivamente ai segnali  $m/z$  166 e 121 (Kitson e al., 1996).



**Figura 6.4** Spettro di massa dell'acido tetradecanoico etil estere



**Figura 6.5** Spettro di massa dell'acido 4-etossibenzoico etilestere

#### **6.4 Termochemolisi-GC/MS con TMAH delle frazioni acquose, ottenute dalla transesterificazione dei campioni umici, e dei residui solidi dopo transesterificazione e metanolisi.**

Le classi di composti rilasciate dalle termochemolisi delle frazioni acquose ottenute dalla transesterificazione dei campioni umici, sono riportate in Tabella 6.3. Sono altresì riportate le percentuali, gli intervalli dimensionali e gli omologhi dominanti.

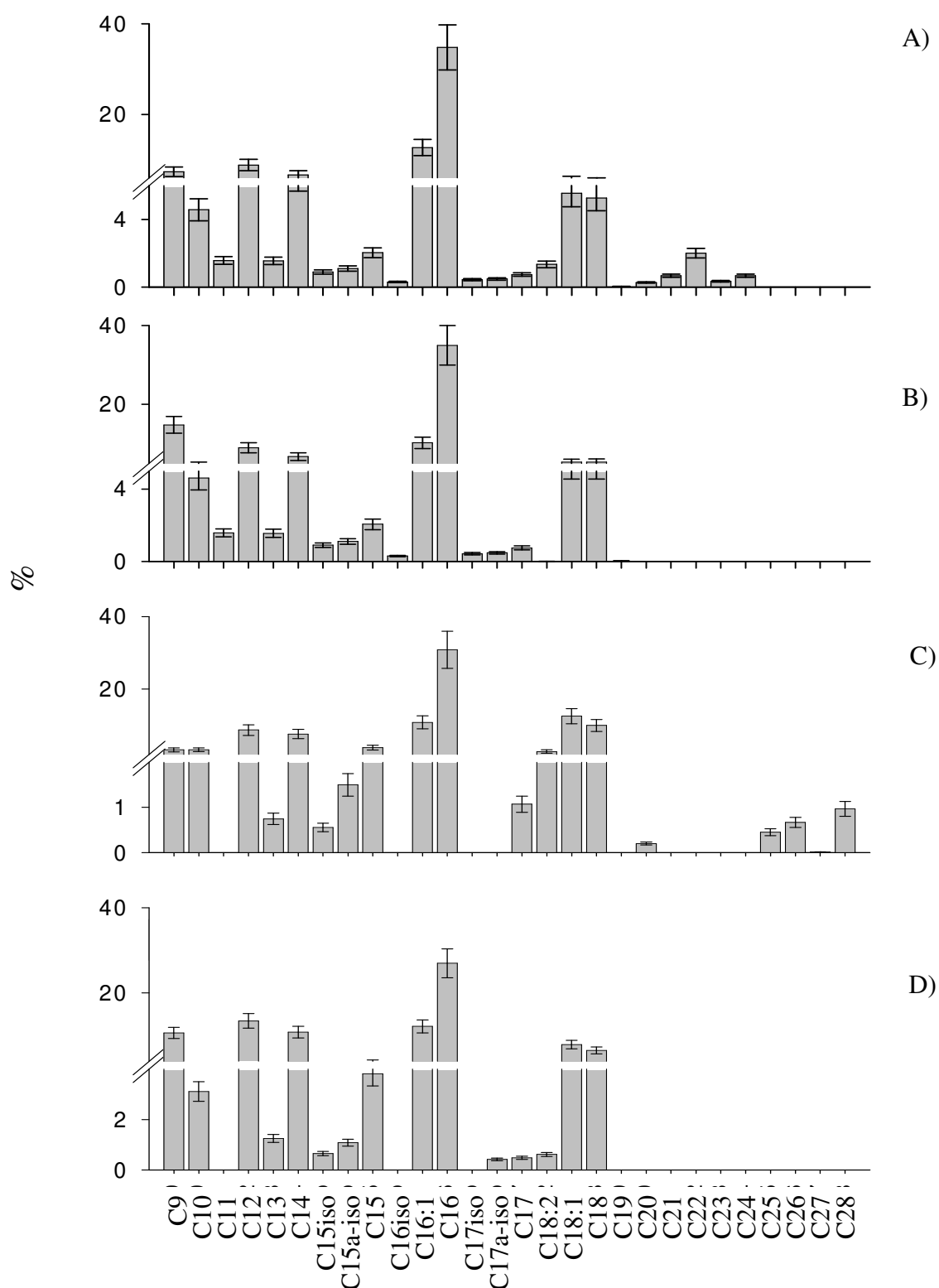
I composti identificati, sebbene siano gli stessi già illustrati e discussi per le termochemolisi dei campioni tal quali, presentano, tuttavia, diverse percentuali relative. In generale, vi è una maggiore presenza di composti eterociclici, mentre vi è una minore percentuale di composti alifatici, comprendenti acidi monocarbossilici, acidi  $\alpha,\omega$ -dicarbossilici, alcani e alcheni, e l'assenza di steroidi e terpenoidi. Un confronto con i prodotti identificati nelle frazioni liposolubili, è pure possibile, sebbene le tecniche utilizzate siano diverse e, come abbiamo già discusso, la termochemolisi può rilasciare prodotti non identificativi delle molecole realmente presenti nelle sostanze umiche, soprattutto se la metilazione dei gruppi polari non è sufficiente.

Le frazioni acquose, infatti, presentano una maggiore percentuale di composti aromatici ed eterociclici rispetto alle frazioni organiche. È possibile che queste classi non siano ben identificate dall'analisi GC/MS delle frazioni organiche o che siano il prodotto di reazioni secondarie della termochemolisi. Tuttavia composti aromatici ed eterociclici sono ritrovati nelle frazioni acquose in percentuali maggiori anche rispetto alle termochemolisi eseguite sui campioni tal quali. Così, si può sostenere che queste classi di composti, o le molecole da cui derivano, siano maggiormente rappresentate nelle frazioni acquose. Tra le frazioni a diverse dimensioni molecolari, inoltre, si ritrovano alcune differenze. La Frazione 3 presenta infatti una percentuale di acidi

grassi molto alta rispetto alle altre frazioni, mentre nella Frazione 2 è stata trovata una percentuale molto alta di composti eterociclici e, nella Frazione 3, un'alta percentuale di composti aromatici.

La percentuale di prodotti derivanti dai carboidrati potrebbe essere molto più alta rispetto a quella riportata in Tabella, infatti molti prodotti indicati come “altri aromatici” potrebbero derivare proprio dagli zuccheri. Tuttavia, non è possibile una assegnazione esclusiva a questa classe di composti, che potrebbe essere di conseguenza sottostimata.

In Figura 6.6 sono riportate le distribuzioni degli acidi alcanoici rilasciati dalle termochemolisi delle frazioni acquose. Gli acidi grassi rappresentano una classe di composti importante anche in queste frazioni, sebbene non sia la classe dominante come nelle frazioni organiche. Anche le distribuzioni dei composti omologhi non sono molto diverse da quelle già descritte per le componenti estratte con solventi organici. Come si può notare in Figura 6.6, per tutti i campioni c'è una dominanza degli omologhi a catena corta ( $C < 18$ ), con una prevalenza dei termini pari rispetto a quelli dispari e con la presenza d'omologhi derivanti dall'attività batterica. Tuttavia, è possibile evidenziare alcune differenze rispetto alle distribuzioni ritrovate per gli estratti organici. Infatti, è osservabile una maggiore presenza di composti insaturi in tutti i campioni umici, ed in particolare per la Frazione 2. Inoltre vi è una netta prevalenza dell'acido esadecanoico rispetto a quello octadecanoico, mentre negli estratti organici le quantità di questi due composti sono risultate molto simili, con l'acido octadecanoico solo leggermente prevalente. Nelle distribuzioni degli acidi alcanoici, relative alle termochemolisi dei campioni tal quali (Figura 6.2), l'esadecanoico e l'octadecanoico sono ritrovati in percentuali simili, ma con l'esadecanoico in quantità leggermente maggiore.



**Figura 6.6** Abbondanza relativa (%) degli acidi alcanoici rilasciati dalla termochemolisi con TMAH delle frazioni acquose ottenute dopo transesterificazione dei campioni umici: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3



In Tabella 6.4 sono riportate le classi di composti rilasciate dalle termochemolisi con TMAH dei residui solidi dopo transesterificazione e metanolisi. Rispetto alle termochemolisi eseguite sui campioni tal quali, abbiamo una minore presenza di componente alifatica, come aspettato, per la rimozione sequenziale durante il frazionamento. Tuttavia, gli acidi carbossilici, gli alcani, gli alcheni e gli acidi dicarbossilici sono stati identificati anche per termochemolisi, a testimonianza della progressiva ripartizione della componente alifatica nei domini idrofobici più interni delle sostanze umiche. Inoltre è ancora possibile osservare delle differenze tra le frazioni a diverse dimensioni. Ancora una volta dalla Frazione a basso peso molecolare è rilasciata una maggiore quantità di prodotti attribuibili alla degradazione dei carboidrati. La Frazione 1, ad alto peso molecolare nominale, invece, presenta il maggior contenuto di composti alifatici e di prodotti aromatici, mentre la Frazione 2 presenta il maggior contenuto di composti eterociclici e di acidi grassi insaturi.

**Tabella 6.3.** Abbondanza relativa (%) e composizione<sup>a</sup> dei maggiori prodotti di termochemolisi con TMAH rilasciati dalle frazioni acquose dopo transesterificazione dell'HA e delle frazioni HPSEC.

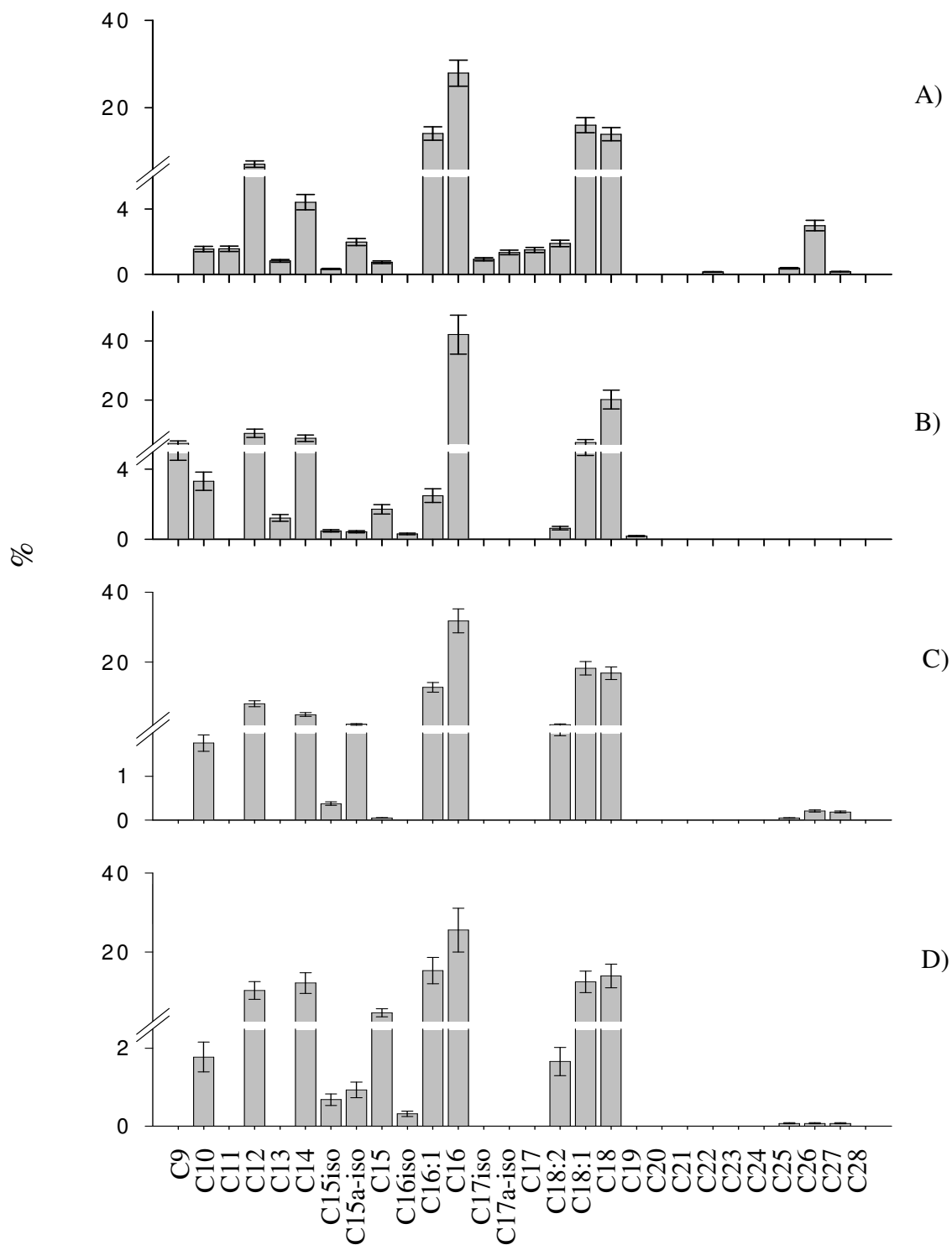
Composti	HA	Frazione 1	Frazione 2	Frazione 3
Derivati della lignina	23.6	17.94	12.2	12.4
Aromatici condensati	0.6	1.1	0.8	.7
Altri aromatici	31.8	28.9	15.2	15.5
Acidi grassi saturi	10.9	12.7	11.8	21.6
	C <sub>13</sub> -C <sub>31</sub> (C <sub>16</sub> )	C <sub>9</sub> -C <sub>31</sub> (C <sub>16</sub> )	C <sub>10</sub> -C <sub>28</sub> (C <sub>16</sub> )	C <sub>30</sub> -C <sub>31</sub> (C <sub>16</sub> )
Acidi grassi insaturi	4.1	2.4	3.3	6.3
	C <sub>9</sub> ,C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	C <sub>7</sub> ,C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>
Alcani/alcheni	2.7	5.3	2.9	6.9
	C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )	C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )	C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )	C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )
Acidi $\alpha,\omega$ -alcandioici	3.6	5.1	1.1C <sub>6</sub> -	5.1
	C <sub>5</sub> -C <sub>11</sub> (C <sub>9</sub> )	C <sub>5</sub> -C <sub>9</sub> (C <sub>9</sub> )	C <sub>22</sub> (C <sub>16</sub> )	C <sub>6</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>6</sub> )
Eterociclici	20.8	22.9	53	29.48
Derivati dei carboidrati	1.9	3.6	1.2	5.25

a. Intervallo che va da C<sub>i</sub> a C<sub>j</sub>; in parentesi sono riportati gli omologhi dominanti.

**Tabella 6.4.** Abbondanza relativa (%) e composizione<sup>a</sup> dei maggiori prodotti di termochemolisi con TMAH rilasciati dai residui solidi finali per l'HA e per le sue frazioni separate per HPSEC.

<b>Composti</b>	<b>HA</b>	<b>Frazione 1</b>	<b>Frazione 2</b>	<b>Frazione 3</b>
Derivati della lignina	24.1	23.2	22	21.5
Aromatici condensati	0.8	0.9	0.6	0.7
Altri aromatici	28.0	42.41	24.5	26
Acidi grassi saturi	12.0	12.5	8.0	7.6
	C <sub>13</sub> -C <sub>31</sub> (C <sub>16</sub> )	C <sub>9</sub> -C <sub>31</sub> (C <sub>16</sub> )	C <sub>10</sub> -C <sub>28</sub> (C <sub>16</sub> )	C <sub>30</sub> -C <sub>31</sub> (C <sub>16</sub> )
Acidi grassi insaturi	1.8	1.4	4.0	1.1
	C <sub>9</sub> ,C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	C <sub>7</sub> ,C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>	C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub>
Alcani/alcheni	2.8	5.0	1.8	3.6
	C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )	C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )	C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )	C <sub>16</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>19</sub> )
Acidi $\alpha,\omega$ -alcandioici	3.3	0.3	4.8	5.1
	C <sub>5</sub> -C <sub>11</sub> (C <sub>9</sub> )	C <sub>5</sub> -C <sub>9</sub> (C <sub>9</sub> )	C <sub>6</sub> -C <sub>22</sub> (C <sub>16</sub> )	C <sub>6</sub> -C <sub>30</sub> (C <sub>6</sub> )
Eterociclici	20.0	10.2	29.9	23
Derivati dei carboidrati	0.8	1.6	4.9	7.9

a. Intervallo che va da C<sub>i</sub> a C<sub>j</sub>; in parentesi sono riportati gli omologhi dominanti.



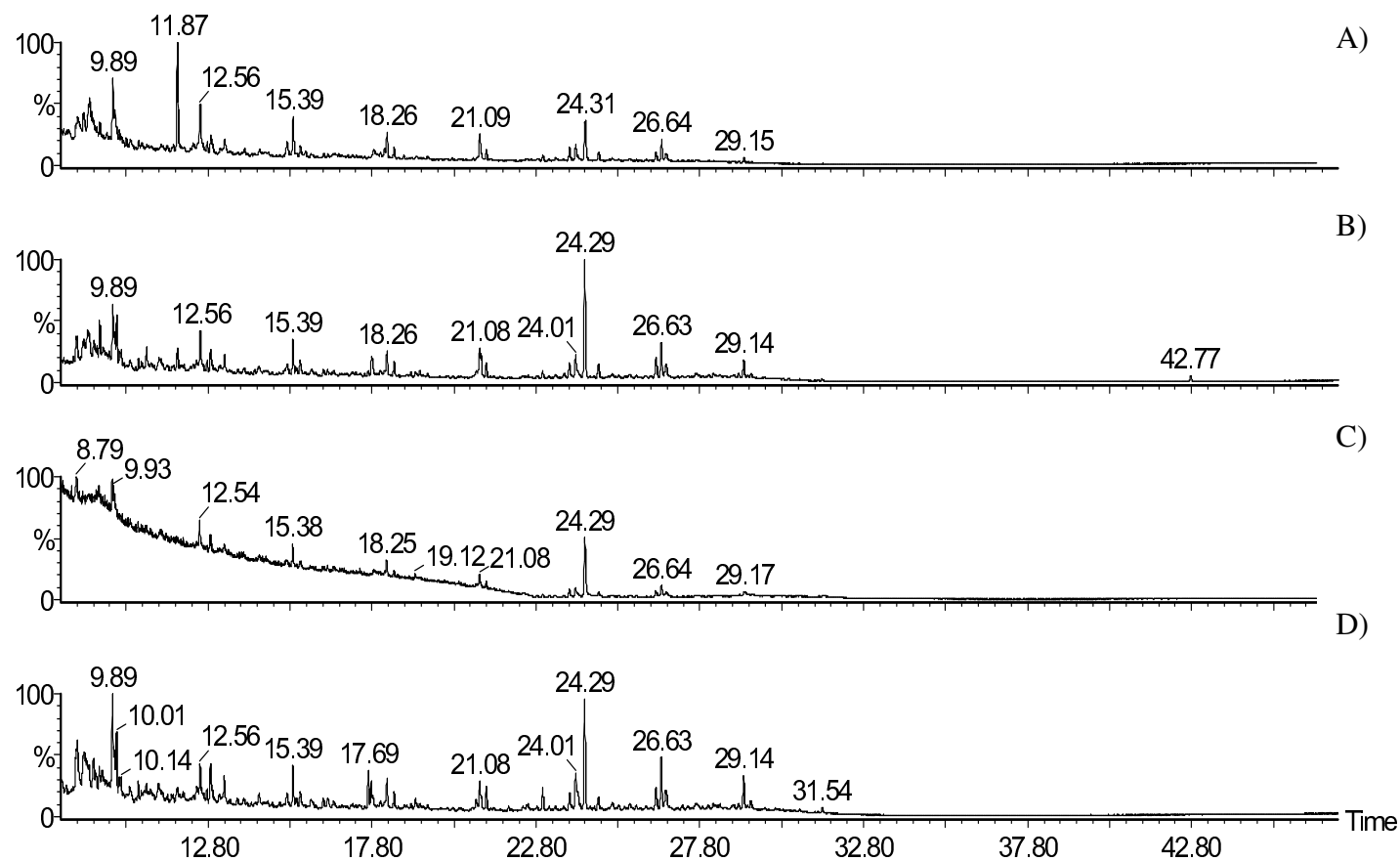
**Figura 6.7** Abbondanza relativa (%) degli acidi alcanoici rilasciati dalla termochemolisi con TMAH dei residui solidi ottenuti alla fine del frazionamento sequenziale dei campioni umici: A) HA, B) Frazione 1, C) Frazione 2, D) Frazione 3.

## 6.5 Conclusioni

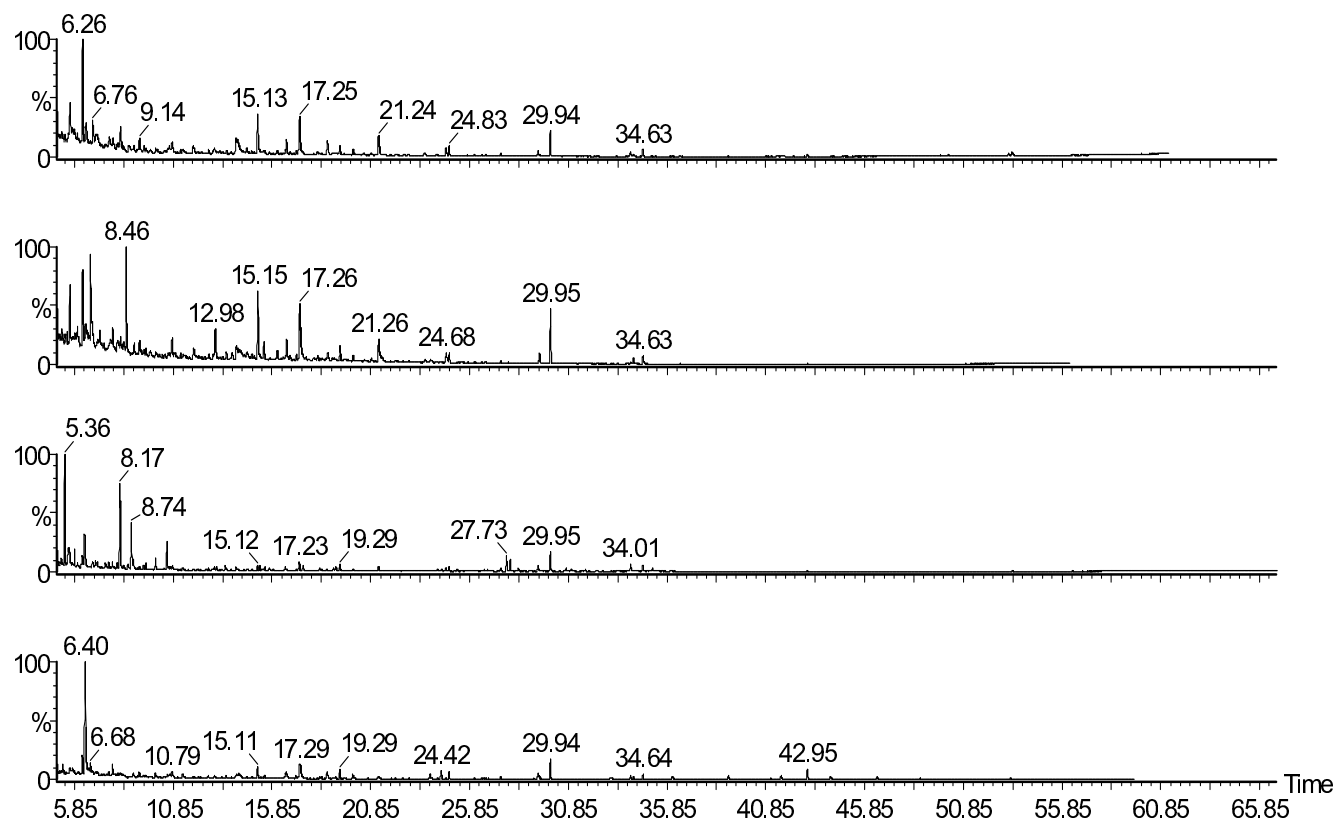
La termochemolisi dell'HA e delle sue frazioni rilasciano un elevato numero di molecole che già sono state identificate mediante GC/MS dopo frazionamento chimico sequenziale. Ad eccezione degli alcoli ed idrossiacidi, che non sono stati identificati, l'abbondanza relativa dei composti alifatici rilasciati dalla termochemolisi concorda generalmente con quanto ritrovato dopo frazionamento sequenziale, mentre i composti aromatici sono stati rilevati per termochemolisi in maggior quantità relativa di quanto osservato per frazionamento sequenziale. Sebbene parte dei prodotti aromatici ottenuti dalla termochemolisi siano attribuibili a reazioni secondarie, tuttavia, l'individuazione di molecole che permettono di risalire alla loro struttura originale, come i derivati della lignina, rappresentano una percentuale importante ed è maggiore di quella ottenuta dal frazionamento sequenziale, oltre a rappresentare un più ampio spettro di composti identificati. L'utilizzo del tetraetilammonio permette inoltre di stabilire che questi prodotti sono impegnati maggiormente in legami esterei e che una percentuale importante è costituita da molecole alifatiche non legate strutturalmente alla matrice umica. Tuttavia, l'inefficienza del tetraetilammonio come agente alchilante, se da un lato fornisce indicazioni su quali siano le molecole sicuramente non legate alla matrice umica, dall'altro, non permette di stabilire in maniera inequivocabile quali siano i composti impegnati in legami esterei. Infatti, i prodotti ottenuti dal frazionamento sequenziale come componenti liberi, coprono uno spettro molto più ampio di classi molecolari di quelli identificati per termochemolisi con TEAH.

L'assenza di standard negli esperimenti di termochemolisi, non ha permesso un confronto quantitativo assoluto con lo studio eseguito mediante frazionamento sequenziale. Tuttavia, è possibile trarre delle conclusioni qualitative che sono comuni

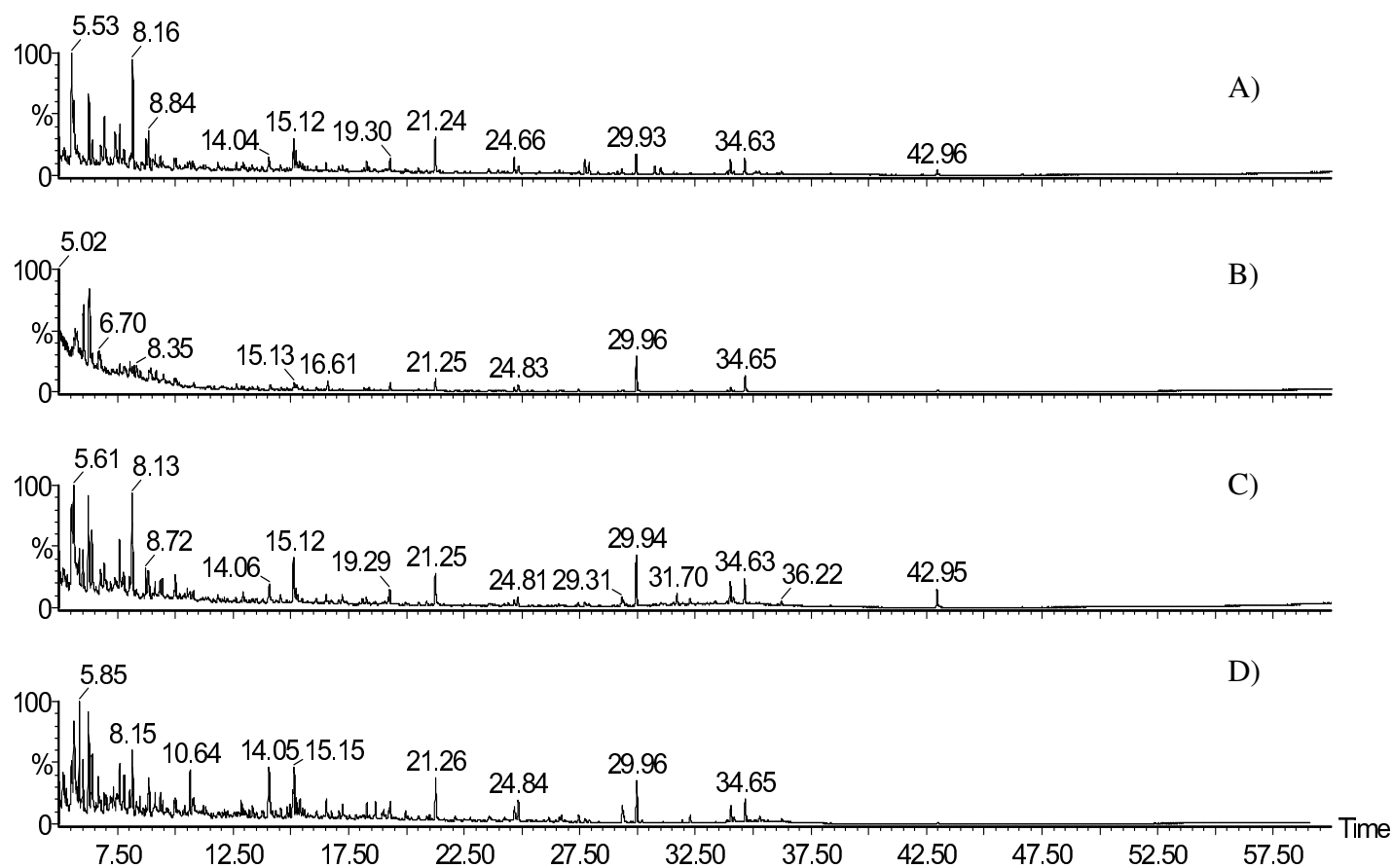
alle due tecniche: la componente libera delle sostanze umiche è formata principalmente da molecole alifatiche, mentre le componenti aromatiche e i carboidrati sembrano essere principalmente impegnati in deboli legami esterei o eterei nelle strutture più fortemente legate. La Frazione a minore dimensione molecolare (Frazione 3) ha un maggiore contenuto di carboidrati, mentre le frazioni a più alto peso molecolare risultano più aromatiche e più alifatiche, con la Frazione 2 che è risultata la più ricca in acidi grassi insaturi. Inoltre la termochemolisi consente di ottenere informazioni supplementari rispetto al frazionamento sequenziale in quanto si identificano molecole contenenti azoto derivato da amminoacidi e peptidi che non sono osservabili per GC/MS dopo frazionamento analitico sequenziale.



**Figura 6.7.** Cromatogrammi ottenuti dalla termochemolisi con TEAH: A) dell'HA, B) della Frazione 1, C) della Frazione 2, D) della Frazione 3.



**Figura 6.8.** Cromatogrammi ottenuti dalla termochemolisi con TMAH delle frazioni acquose ottenute dopo transesterificazione: A) dell'HA, B) della Frazione 1, C) della Frazione 2, D) della Frazione 3.



**Figura 6.9.** Cromatogrammi ottenuti dopo la termochemolisi con TMAH sui residui solidi dopo transesterificazione e metanolisi.: A) dell'HA, B) della Frazione 1, C) della Frazione 2, D) della Frazione 3.



**Tabella 6.5** Composti<sup>a</sup> rilasciati dalle termochemolisi con TMAH dei campioni umici

TR <sup>b</sup>	Composti	Tipo	RT	Composti	Tipo
5.42	2,3-dimetilidrochinone	Pr	21.61	C16 alcano	Lp
6.3	1-metil, 4-OMe,benzene	Lg P2	22.3	Acido3,4-diOMe benzeneacetico ME	Lg G6
6.69	N,N-dimetil- Benzenemetanammina	Pr			
8.18	1-(1,1-dimetiletil)-3- fenilaziridinone	Pr			
8.9	3,4 di-OMe benzene	Lg G1	22.6	<i>Cis</i> -1-(3,4diOMe fenile)- 2-OMe-ethylene	Lg G7
9.2	benzene, 4-OMe, 1-ethenyl	Lg P3	22.9	<i>Trans</i> -1-(3,4diOMe	Lg G8
			23.1	acido 4-OMe cinnamico ME	P18
10.8	1,5,5-trimetil,2-4- imidazolodione	Pr	24.1	<i>cis</i> -1-(3,4diOMe fenile)- 1-OMe propene	Lg G10
11.3	acido C6 dioico DIME	Mic	24.3	C17 alcano	Lp
11.9	4-OMe benzaldeide	Lg P4			
12.26	3-metil-1H-indolo	Pr	24.6	3,4,5 triOMe acetophenone	Lg S5
13.58	<i>n</i> -C10 FAME	Lp			
13.24	3,4,5 tri-OMe benzene	Lg S1	24.7	triOMe benzoic acid ME	Lg S6
14.8	dimetil indolo	Pr	24.8	<i>n</i> -C14 FAME	Lp
14.9	4-etenil- 3,4-diOMe benzene	LgG3			
15.0	triOMe benzene	Ps			
15.2	acido 4-OMe benzoico ME	LgP6	24.8	<i>n</i> -C14 FAME	Lp
15.5	acido 4-OMe benzeneacetic	Lg P2			
15.6	Metil metossi 2 ,3,4-tri-O- metil-D-xilopiranoside	Ps	24.9	<i>trans</i> -1-(3,4diOMe fenile) -1-OMe propene	Lg G11
16.5	(m/z 88, 101)	Ps			
17.1	acido C8 dioico DIME	Mic	26.5	C15 <i>iso</i> FAME	Mic
17.6	5-O-Me 2metil 1H indolo	Pr	26.6	<i>cis</i> -1-(3,4,5 triOMe fenile) 2-OMe-ethylene	Lg S7
17.7	1-OMe-2-(4-OMefenile) etilene	Lg P7			
18.2	3,4 diOMe benzaldehyde	Lg G4	26.8	C15 <i>anteiso</i> FAME	Mic
18.9	Acido benzenedicarbossilico ME	TMAH	26.9	C18alcano	
19.3	<i>n</i> -C12 FAME	Lp	27.0	<i>trans</i> -1-(3,4,5triOMe	
19.96	Acido C9 dioico DIME	Mic			
20.8	3,4-diOMe acetophenone	Lg G5	27.4	<i>n</i> -C15 FAME	Lp
21.3	3,4-diOMe benzoic acid ME	Lg G6	27.6	<i>trans</i> -1-(3,4,5tri OMe fenil-1-OMe) propene	Lg S11

21.5	3,4,5-triOMe benzaldehyde	Lg S4			
29.2	1-(3,4 -diOMe fenile)-1,2,3 triOMe propane thr/erit	Lg S14	50.6	C30 n-alcane	Lp
29.7	1-(3,4 -diOMe fenile)-1,2,3 triOMe propane thr/erit	Lg S15	51.5	Cholest-5-en-3-OMe	Lp/Tp
			51.9	Acido C24 dioico DIME	Bp
30.0	n-C16 FAME	Lp	52.1	C31 alcane	Lp
			53.3	C28 FAME	Lp
31.0	C17 iso FAME	Mic	53.7	Stigmasterol-OMe	Lp/Tp
31.5	C17 anteiso FAME	Mic	54.9	C29 FAME	Lp
			55.6	OMe-Sitosterolo	Lp/Tp
32.3	n-C17 FAME	Lp	56.4	C30 FAME	Lp
33.5	Dehydroabietol-OMe	Dt	57.3	OMe-Amyrin	Lp/Tp
33.8	C22 alcane	Lp			
34.0	C18:1 FAME	Lp			
34.7	C18 FAME	Lp			
36.1	C23 alcane	Lp			
39.0	C20 FAME	Lp			
39.1	Dehydroabietic acid me	Dt			
39.2	C24 alcane	Lp			
41.5	Labd-8-ene-15,18-dioic acid	Lp/Dt			
42.9	C22 FAME	Lp			
43	C25 alcane	Lp			
44.8	C23 FAME	Lp			
45.4	C20 dioic acid DIME	Bp			
46.6	C27 alcane	Lp			
46.7	C24 FAME	Lp			
47.3	C28 alcane	Lp			
48.96	acido C22 dioico DIME	Bp			
49	C29 alcane	Lp			
50.1	C26 FAME	Lp			

- a. **Bp** = prodotti derivati dai biopolimeri vegetali **Lp** = derivati dai lipidi vegetali (**Dt** diterpenoide; **Tp** triterpenoide); **Pr** = derivati dalle proteine **Lg** = derivati dalla lignina; **Mic** = prodotti di origine microbica; **PS** = derivati dai polisaccaridi; **OMe** = metossi; **FAME** = acido alcanoico metil estere; **ME** = metil estere; **DIME** = dimetil estere.
- b. **TR** = tempo di ritenzione

**Tabella 6.6** Composti<sup>a</sup> rilasciati dalle termochemolisi con TEAH dei campioni umici.

T.R. <sup>b</sup>	Composti	tipo	T.R.	Composti	tipo
5.24	Trietilammina	TEAH	24.15	3-metil-9H-fluorene,	PA
5.67	Etossibenzene	Pr,Lg,Ps	24.3	benzoic acid, 2-etilhexyl estere	Lp
6.63	1,2-etandiammina, n,n,n'-trietil-	TEAH	24.72	C18:1 alchene	Lp
7.69	,1-etossi-3-metil- benzene	Lg	25.13	C18alcano	
8.8	1-isociano-2-metil- benzene	Pr	25.54	C14FAEE	Lp
9.7	4-etil-2,3-dimetil-1H-pirrolo	Pr	26.29	cis,cis-1,6-dimetilspiro[4.5]decane	
9.9	4-undecene, 5-metil-, (z)-	Lp	26.48	Acido tetradecanoic, etil ester	Lp
9.96	naftalene	PA	26.63	C19alcano	
10	1-etossi-4-metossi-benzene	Lg	27.71	2-pentacosanone	Lp
10.94	4-etossistirene	Lg	28.09	C15iso FAEE	Mic
12.91	2-metil- naftalene	PA	28.28	C15a-iso FAEE	Mic
13.9	benzaldehyde, 4-etossi-	Lg	29	C20:1	Lp
15.15	2-etenyl naftalene	PA	29.05	C15 FAEE	Lp
16.68	ethanone, 1-(4-etossifenil)-	Lg	29.16	C20alcano	Lp
17.44	2,3-dimetossifenilacetone nitrile	Pr	29.81	C16FAEE	Lp
19.17	dibenzofurano	Ps	31.43	C16FAEE	Lp
19.27	Acido 4-etossi-benzoico etil estere	Lg	31.56	1-fluoro-dodecane	
19.36	Trietilammina	TEAH	33.2	C21 alcano	Lp
21	1H-fenalene	PA	33.86	C22:1 alchene	Lp
21.14	C12 FAEE	Lp	36.07	C22 alcano	Lp
22.85	trietilammina	TEAH			
23.41	1-chloro-tetradecane				
23.67	1,13-tetradecadiene	Lp			
23.83	C17:1alchene	Lp			
24.02	C17alcano	Lp			

- a. **Pr** = derivati dalle proteine **Lg** = derivati dalla lignina; **Mic** = prodotti di origine microbica; **PS** = derivati dai polisaccaridi; **PA** = aromatici condensati; **TEAH** = prodotti derivati dall'agente alchilante. **OME** = metossi; **FAEE** = acido alcanoico etil estere; **EE** = etil estere;
- b. TR = tempo di ritenzione

## CAPITOLO 7

### STUDIO ESI/MS DEI CAMPIONI UMICI.

#### 7.1 Introduzione

Negli ultimi anni si è registrato un crescente interesse per l'utilizzo di metodi di ionizzazione "soft" per l'indagine spettroscopica di massa delle sostanze umiche: la Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI-MS) e l'Electrospray Ionization (ESI-MS). Questo interesse è da imputare alla capacità di queste tecniche di ionizzare le molecole umiche senza frammentarle evitando così artefatti.

Nella maggior parte degli esperimenti riportati in letteratura, soluzioni acquose di acidi umici e di acidi fulvici sono iniettati direttamente nell'ESI senza una precedente separazione. Tuttavia, non tutte le molecole infuse simultaneamente in un elettrospray vengono ionizzate con la stessa efficacia e, data la complessità delle molecole umiche, non è possibile chiarire quale parte delle masse sono ben rilevate e quali invece sono sottostimate. Parallelamente, alcuni autori attribuiscono a questa tecnica altri inconvenienti come la formazione di ioni multicarica (Leenheer *et al.*, 2001), la frammentazione delle molecole (McIntyre *et al.*, 1997) e la ionizzazione dipendente dalle masse (Stenson *et al.*, 2002). Un'altra complicazione è da imputare alla non disponibilità di standard per le sostanze umiche.

Recentemente l'analisi degli acidi umici e fulvici per mezzo della ESI-MS è stata migliorata per mezzo dell'utilizzo della cromatografia ad esclusione molecolare "in linea" alla sorgente di ionizzazione (Reemtsma e These 2003; Piccolo e Spiteller, 2003). La cromatografia ad esclusione molecolare è un passaggio importante in quanto

provvedendo ad una separazione in base al volume idrodinamico delle molecole, riduce la polidispersità delle miscele (Hunt *et al.*, 1998) ed è già stata applicata con successo in alcuni studi sulle sostanze umiche accoppiata ad altre tecniche spettroscopiche come l'NMR (Conte *et al.*, 2006).

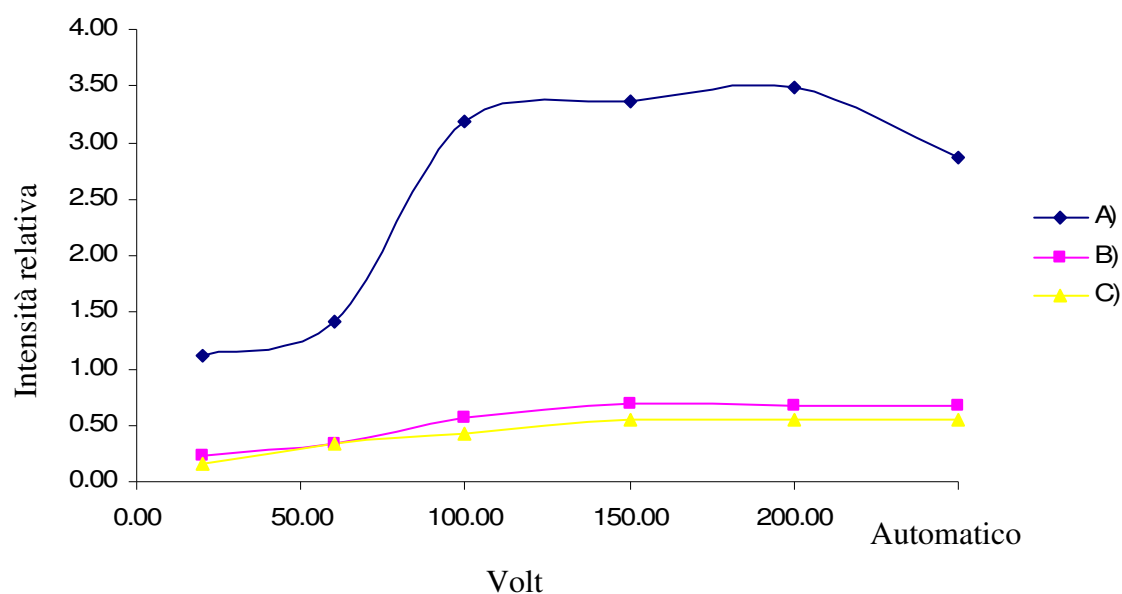
In questa tesi si è applicata l'ESI-MS per studiare frazioni di sostanze umiche ben più omogenee del materiale di partenza ottenute, prima, da una separazione HPSEC preparativa e, poi, da una serie di reazioni non distruttive. Su questi campioni è stata eseguita un'ulteriore separazione mediante HPSEC analitico in linea con la ESI-MS. Per gli spettri di massa ottenuti si è anche tentato di identificare le strutture molecolari di alcuni ioni mediante spettrometria di massa tandem.

## **7.2 Studio del solvente e del “cone voltage”.**

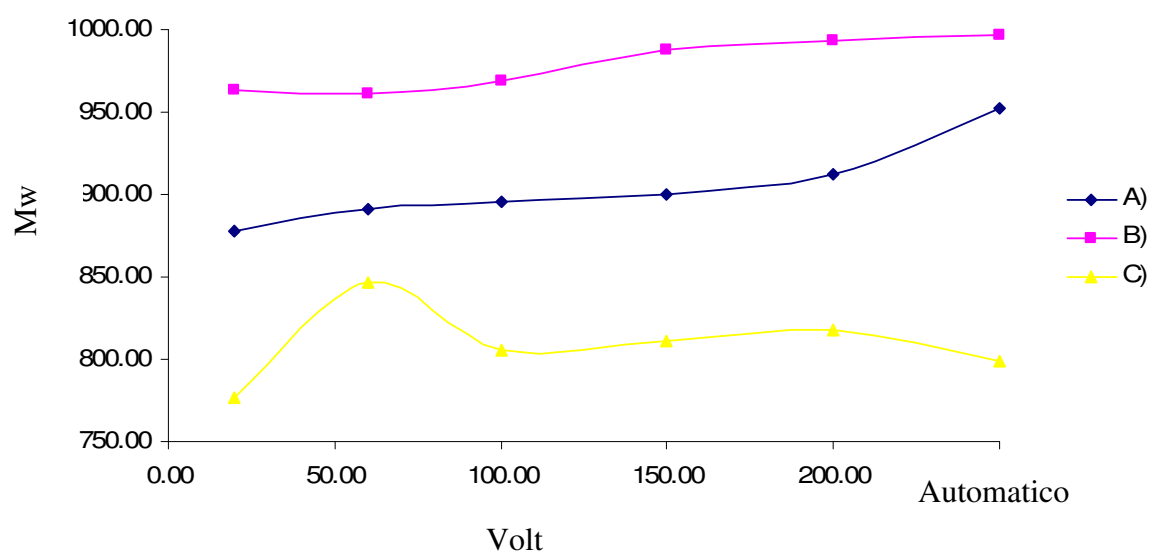
Uno studio preliminare è stato eseguito sugli effetti di tre diversi solventi (ammoniaca 0.05%/acetonitrile 9:1, acetato di ammonio 1mM/acetonitrile 9:1, carbonato di ammonio mM/acetonitrile 9:1) sull'acquisizione degli spettri di sostanze umiche, a diversi valori del “cone voltage” (CV): -20V, -60V, -100V, -150V, -200V, e in modalità automatica di. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in ionizzazione negativa. Il “cone voltage” incide particolarmente sull'efficacia della ionizzazione. Bassi valori di questo parametro determinano una bassa energia di collisione delle molecole con il gas di desolvatazione, e, quindi, una scarsa ionizzazione. Alti valori di cone voltage determinano invece un'alta energia di collisione con il gas ed una dissociazione molecolare elevata. Il valore ottimale di questo parametro dipende dalla massa della molecola da ionizzare. Perciò, esso deve essere ottimizzato nella procedura di di calibrazione dello strumento per ogni specifico composto in studio. Per

esperimenti “full scans”, come quelli eseguiti per miscele complesse come le HS, lo strumento utilizzato in questo lavoro, il TSQ Quantum, permette la variazione automatica del “cone voltage”, in modo che ioni a basso peso molecolare siano favoriti per un certo tempo, poi gli ioni intermedi e così via, in modo che tutti gli ioni possano in principio essere trasmessi all’analizzatore di massa. Dai picchi dei cromatogrammi ionici totali (TIC) ottenuti (Figura 7.1), emerge che la migliore ionizzazione si ottiene con ammoniaca 0.05%/acetonitrile (9:1) mentre con gli altri solventi i segnali osservabili sono meno intensi.. Inoltre, negli spettri ottenuti con acetato d’ammonio (Figura 7.3 A), è visibile una diminuzione delle intensità nell’intervallo 500-650 m/z già a bassi valori del “cone voltage”, con un aumento delle intensità ionica nell’intervallo di masse basse. Questo comportamento potrebbe essere imputato ad una frammentazione delle masse nell’intervallo m/z 500-650, ma può essere dovuto anche ad una migliore ionizzazione delle masse nelle altre regioni spettrali, che assumono un’importanza relativa maggiore all’incrementare del CV. Questo fenomeno invece è osservabile, negli spettri ottenuti con ammoniaca 0.05%/acetonitrile 9:1 come solvente (Figura 7.3), solo a valori assoluti del CV molto più alti (-150 e -200).

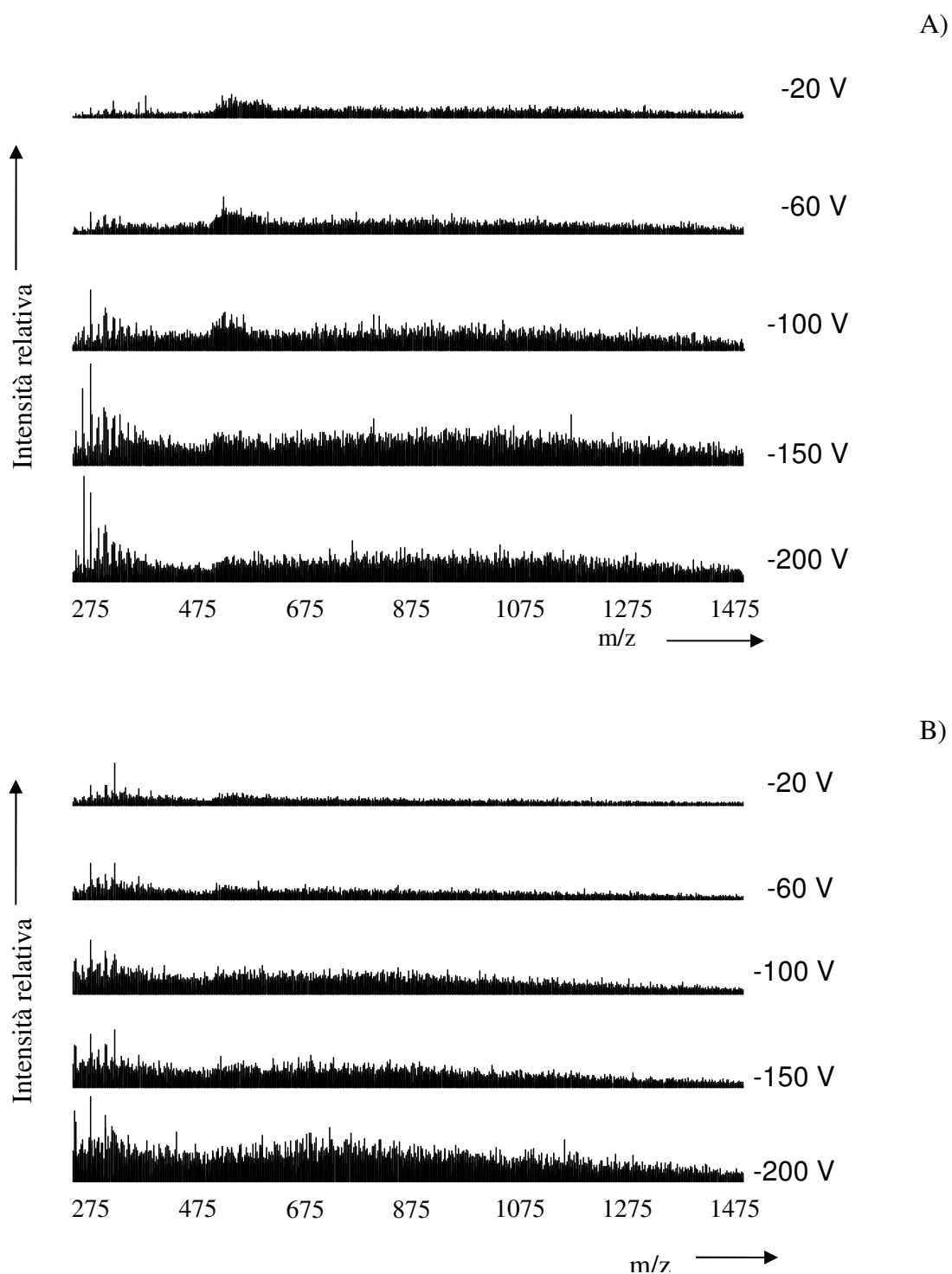
Dagli spettri acquisiti sono calcolati i valori del peso molecolare peso-medio ( $M_w$ ) e del peso molecolare numero-medio ( $M_n$ ) considerando  $z = 1$  (Figura 7.2). Sebbene dagli spettri ottenuti con acetato d’ammonio, sia visibile una possibile frammentazione degli ioni all’aumentare del CV, i valori calcolati di  $M_w$  e  $M_n$  aumentano all’aumentare del voltaggio (Figura 7.2).



**Figura 7.1** Intensità relativa dei picchi “TIC” ottenuti: A) con ammoniaca 0.05%/acetonitrile 9:1, B) acetato di ammonio 1mM/acetonitrile 9:1, C) con carbonato di ammonio mM/acetonitrile 9:1



**Figura 7.2** Dimensioni molecolari peso-medio verso CV per i picchi “TIC” ottenuti con: A) con ammoniaca 0.05%/acetonitrile 9:1, B) acetato di ammonio 1mM/acetonitrile 9:1, C) con carbonato di ammonio mM/acetonitrile 9:1



**Figura 7.3** Spettri di massa dell'HA ottenuti a vari valori di “cone voltage” con: A) acetato di ammonio 1mM/acetonitrile 9:1, B) ammoniaca 0.05%/acetonitrile 9:1.



È evidente che all'aumentare del CV si ottiene sempre una migliore ionizzazione delle molecole ad alto peso molecolare.

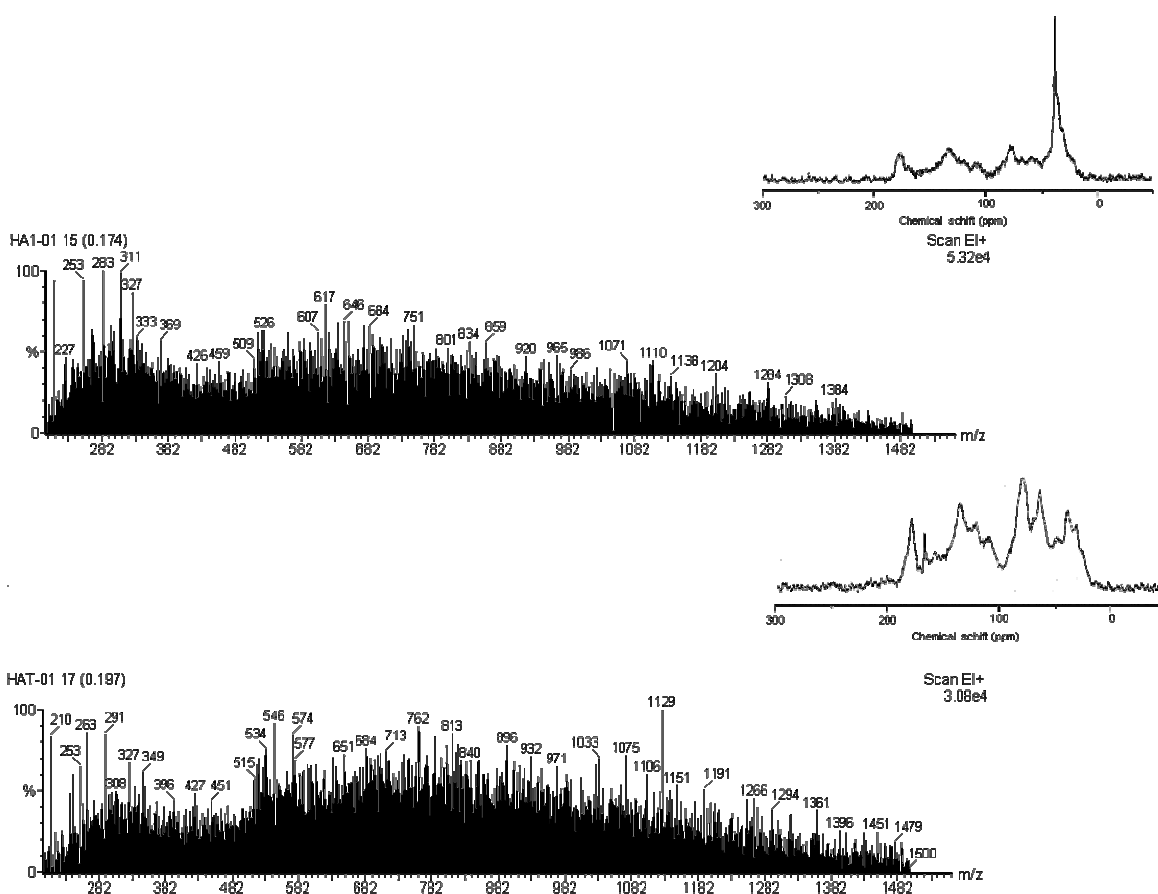
Per gli esperimenti condotti con  $\text{NH}_3$  0.05%/AcN (9:1), sono stati calcolati valori di Mn ed Mw leggermente inferiori da quelli ottenuti con l'acetato d'ammonio, ma bisogna considerare che lo ione ammonio può formare degli addotti con le molecole cariche negativamente e quindi fornire valori di pesi molecolari più alti. Comunque, gli Mn e Mw più alti sono acquisiti con il CV in modalità automatica, sebbene il TIC presenti un picco con intensità minore di quelli ottenuti con il CV a -150 e -200 V. Evidentemente, questi ultimi valori sperimentali, se da un lato favoriscono la ionizzazione, dall'altro essi sono abbastanza alti da poter determinare la frammentazione di alcune molecole. Con il CV in automatico si ottiene invece sia una buona ionizzazione delle molecole con un peso molecolare alto, sia una frammentazione trascurabile.

### **7.3 Caratterizzazione mediante ESI-MS dei campioni umici**

Nelle figure 7.4 e 7.5 riportiamo gli spettri di massa ottenuti mediante infusione diretta dell'acido umico da Vico, dell'acido umico da Vico titolato (HA) e delle tre frazioni HPSEC, utilizzando il CV in modalità automatica e con ionizzazione in modalità negativa. Come è evidente, gli spettri presentano una complessa distribuzione di picchi presenti a quasi tutte le masse nominali. Questi spettri sono molto simili a quelli osservati da numerosi altri gruppi di ricerca (Brown e Rice, 2000; Leenher *et al.*, 2001; Novotny *et al.*, 1995; Planque *et al.*, 2001). In Tabella 7.1 sono riportati i valori di Mn e Mw calcolati per le frazioni HPSEC e le frazioni ottenute dal frazionamento

chimico sequenziale con il “cone voltage” in automatico. In generale si può osservare che i valori Mn e Mw sono tutti al di sotto dei 1000 Da, in accordo con la teoria supramolecolare e sono più bassi di quelli ottenuti con metodi convenzionali.

In particolare alcuni autori quali Stenson e al. (2002) sulla base di risultati molto simili a quelli di questa tesi, ipotizzano tre diversi scenari concernenti la distribuzione dei pesi molecolari delle sostanze umiche: 1) Le HS sono effettivamente composte di molecole a basso peso molecolare (<1000 Da), che sembrano più grandi quando determinate con altre tecniche come la cromatografia ad esclusione molecolare (SEC),



**Figura 7.4** Spettri ESI-MS dell’acido umico da Vico tal quale (A) e dell’acido umico (HA) titolato a pH 7 e filtrato (B). Gli inserti mostrano i rispettivi spettri CPMAS-  $^{13}\text{C}$  NMR

l'osmometria a pressione di vapore, e diffrazione a raggi X ad angolo ristretto; 2) Le sostanze umiche consistono di molecole che si frammentano nella sorgente ESI o acquisiscono cariche multiple; 3) Le HS consistono di molecole ad alto peso molecolare che non ionizzano bene e che non possono essere analizzate. Questi stessi autori, utilizzando la tecnica ESI-FT-ICR (risonanza ionica ciclotronica) ad alta risoluzione, hanno dimostrato che la ESI non determina la formazione di ioni multicarica. Infatti, essi riportano degli spettri ad alta risoluzione, dove non sono visibili picchi isotopici di masse frazionarie.

**Tabella 7.1** Valori Mn e Mw calcolati dagli spettri ESI-MS dell'HA e delle frazioni HPSEC acquisiti con “cone voltage” in automatico.

	Tal Quale	D <sup>a</sup>	RHI <sup>b</sup>	FADL <sup>c</sup>	FAFL <sup>d</sup>
HA	649(±6)	655(±15)	716(±38)	650(±10)	604(±6)
	743(±7)	757(±6)	811(±38)	755(±38)	707(±1)
Frazione 1	621(±1)	616(±8)		686(±2)	665(±45)
	724(±3)	714(±6)		783(±2)	761(±44)
Frazione 2	630(±3)	644(±11)		636(±2)	651(±45)
	723(±4)	740(±14)		743(±2)	749(±13)
Frazione 3	585(±4)	646(±13)		649(±16)	625(±6)
	690(±6)	739(±17)		756(±26)	719(±7)

a. D = residuo solido dopo transesterificazione e metanolisi

b. RHI = residuo solido dopo trattamento con acido iodidrico.

c. FADL = Frazione acquosa debolmente legata rilasciata dopo transesterificazione

d. FAFL = Frazione acquosa fortemente legata rilasciata dopo metanolisi

L'esperienza sperimentale di questa tesi induce a pensare che per confrontare i pesi molecolari medi ricavati da spettri acquisiti da campioni umici diversi, ottenuti nelle stesse condizioni d'acquisizione, sia necessario condurre uno studio preliminare in

cui più campioni siano analizzati sotto diverse condizioni e verificare che le differenze o le similitudini nei pesi molecolari medi siano le stesse anche al variare dei parametri. Da tutte le componenti ottenute dal frazionamento sequenziale di questa tesi, sono stati acquisiti spettri ESI-MS mediante infusione diretta ed utilizzando il CV a -60V e -100V in modalità automatica. Inoltre sono stati acquisiti degli spettri con il CV in automatico dopo separazione attraverso colonna cromatografica ad esclusione molecolare in linea con la ESI-MS.

I valori di  $M_n$  ed  $M_w$  esono risultati tutti molto vicini. Tuttavia al variare del CV, le differenze tra i vari campioni non sono risultate essere le stesse, rendendo poco veritiero un confronto tra due campioni, nonostante gli spettri fossero stati acquisiti con gli stessi parametri. Questo è un problema legato alla molteplicità dei gruppi funzionali presenti nei campioni unici, i quali ionizzano con modalità diversa. La variazione di un parametro può dunque incidere in maniera diversa su molecole che presentano gruppi funzionali differenti, cosicchè campioni di diversa composizione non rispondono allo stesso modo ad una variazione del “cone voltage”. Per questo motivo, occorre sottolineare che se anche gli spettri di vari campioni fossero acquisiti con le stesse condizioni, il confronto deve essere fatto con cautela ed è necessario avere delle informazioni spettrali che diano indicazioni sulla composizione dei campioni in esame.

Nella Tabella 7.2 riportiamo i pesi molecolari numero-medio e peso-medio ottenuti con la cromatografia ad esclusione molecolare “in linea” con la sorgente ESI. I valori sono mediamente superiori a quelli ottenuti con le altre modalità. Sia per l’HA che per le tre frazioni ottenute mediante HPSEC preparativa, si osservano, nel profilo di eluizione spettrale, due picchi che corrispondono alla separazione delle masse alte da quelle basse.. Anche i pesi molecolari medi delle masse corrispondenti a questi picchi,

sono maggiori rispetto a quelli ottenuti mediante infusione diretta. Questo può essere spiegato con il fatto che la separazione cromatografica del materiale unico in eluizione riduce la competizione per le cariche elettriche durante la formazione degli ioni in fase gassosa e migliora la ionizzazione degli analiti. Tale fenomeno può aumentare la ionizzabilità di ioni difficilmente ionizzabili, come le associazioni uniche a più alta dimensione molecolare in cui le molecole sono più strettamente associate fra loro.

**Tabella 7.2** Valori Mn e Mw calcolati dagli spettri ottenuti con la cromatografia ad esclusione molecolare in linea alla ESI-MS dell'HA e delle frazioni HPSEC.

		Tal quale	D <sup>a</sup>	RHI <sup>b</sup>	FADL <sup>c</sup>
HA	Totale Mn	692(±9)	675(±8)	675(±14)	630(±11)
	Mw	793(±11)	779(±15)	783(±17)	765(±15)
	1° picco Mn	727(±8)	691(±7)		
	Mw	814(±19)	795(±10)		
	2° picco Mn	689(±12)	682(±8)		
	Mw	798(±14)	780(±11)		
Frazione 1	Totale Mn	643(±9)	670(±7)		616(±9)
	Mw	784(±13)	773(±15)		745(±12)
	1° picco Mn	714(±5)	678(±8)		
	Mw	811(±7)	785(±8)		
	2° picco Mn	645(±9)	656(±7)		
	Mw	771(±12)	768(±10)		
Frazione 2	Totale Mn	693(±8)	690(±8)		662(±8)
	Mw	787(±14)	788(±13)		788(±11)
	1° picco Mn	723(±15)	716(±9)		
	Mw	802(±21)	799(±14)		
	2° picco Mn	705(±16)	687(±8)		
	Mw	791(±19)	799(±12)		
Frazione 3	Totale Mn	595(±7)	668(±7)		596(±5)
	Mw	718(±10)	778(±15)		729(±9)
	1° picco Mn	672(±4)	720(±9)		
	Mw	772(±8)	811(±13)		
	2° picco Mn	546(±5)	694± (8)		
	Mw	708(±9)	790(±11)		

a. D = residuo solido dopo transesterificazione e metanolisi

b. RHI = residuo solido dopo trattamento con HI

c. FADL = Frazione acquosa debolmente legata rilasciata dopo transesterificazione

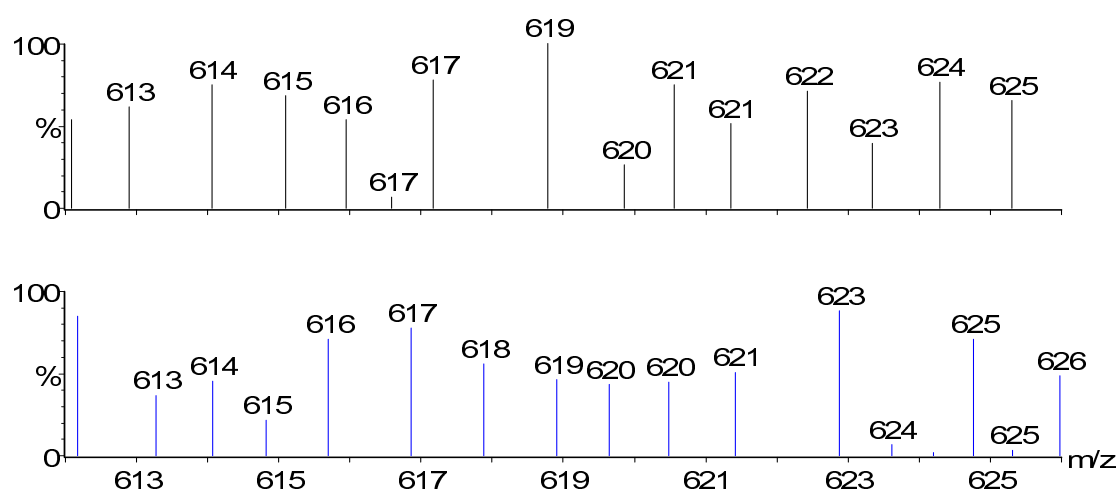
Ciò potrebbe spiegare perchè i pesi medi calcolati dagli spettri ottenuti mediante HPSEC-ESI-MS presentino valori leggermente più alti rispetto a quelli ottenuti mediante infusione diretta.

Benchè l'ESI-MS, potrebbe avere maggiori potenzialità, rispetto ad altre tecniche, per la valutazione del peso molecolare assoluto delle componenti presenti nelle associazioni umiche complesse, i risultati mostrati in questa tesi, insieme a quelli riportati in letteratura, indicano che è necessario dell'ulteriore lavoro sperimentale per giungere a delle condizioni ottimali di acquisizione. Appare sempre più necessario individuare degli standard rappresentativi delle varie classi di composti che compongono le sostanze umiche e mettere a punto le condizioni ottimali per la ionizzazione d'ogni classe di molecole. Di conseguenza, esperimenti ESI-MS su sostanze umiche, condotti in modo da cercare la massima ionizzazione in successione di ogni classe di composto, potrebbero fornire dati relativi ai pesi molecolari medi delle sostanze umiche più vicini a quelli reali. L'utilizzo del CV automatico e della HPSEC "in linea" con la ESI-MS, costituiscono comunque un sensibile miglioramento rispetto alla infusione diretta con l'utilizzo di un valore unico del CV.

Gli esperimenti di questa tesi hanno inoltre mostrato altre peculiarità che meritano di essere discusse. Infatti, i campioni umici, sia dopo separazione HPSEC, sia dopo frazionamento chimico sequenziale, hanno sempre  $M_n$  ed  $M_w$  molto simili. Poichè il frazionamento chimico sequenziale rompe i legami esterei ed eterei tra le molecole umiche, ci si dovrebbe aspettare dei valori di  $M_n$  ed  $M_w$  inferiori. Invece, i valori di  $M_n$  ed  $M_w$  dei residui solidi dopo frazionamento sequenziale, sono simili o addirittura maggiori dei campioni non idrolizzati.

## Spettrometria di massa tandem (ESI-MS/MS)

Alcuni ioni sono stati scelti per eseguire degli esperimenti con spettroscopia di massa tandem interfacciata con ionizzazione ad elettrospray. La scelta degli ioni da studiare non è immediata. Se uno ione non ha una concentrazione adeguata, la sua frammentazione, negli esperimenti di spettrometria tandem, dà luogo ad uno spettro che non si distingue dal rumore di fondo. Per questo la scelta deve cadere su quegli ioni che presentano, negli spettri ESI-MS in singola scansione, delle intensità relative significative. Tuttavia se si acquisiscono più spettri ESI/MS dello stesso campione con le medesime condizioni sperimentali, si nota che gli ioni non presentano sempre la stessa intensità relativa, soprattutto per valori di  $m/z$  superiori a 350 (Figura 7.6). Alcuni picchi, probabilmente, non rappresentano singole molecole, ma aggregati che possono separarsi in esperimenti successivi. Pertanto, sebbene uno ione abbia una buona intensità relativa in un unico spettro ESI-MS, la sua concentrazione potrebbe essere insufficiente, in una successiva ionizzazione, per la frammentazione ed acquisizione del relativo spettro massa-massa.



**Figura 7.6** Intervallo di massa 612-626 di due spettri ESI-MS, della Frazione 1, acquisiti in due esperimenti successivi con le stesse condizioni sperimentali

Di conseguenza, gli ioni da frammentare devono presentare sempre un'intensità significativa, anche quando vengono eseguiti più esperimenti ESI-MS sullo stesso campione.



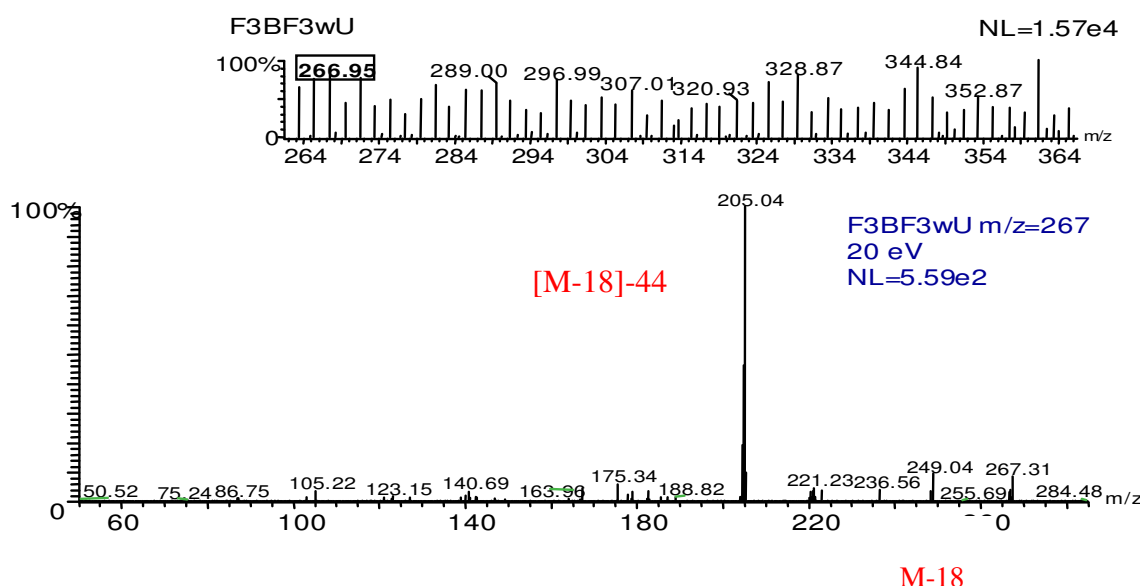
**Figura 7.7** Intervallo di massa 251-284 di due spettri ESI-MS, della Frazione 1, acquisiti in due esperimenti successivi con le stesse condizioni sperimentali

Perciò, sono stati acquisiti cinque spettri ESI-MS, con le stesse condizioni sperimentali, per ogni campione. Riportando su un foglio di calcolo i valori  $m/z$  e le corrispondenti importanze relative, è possibile, mediante l'applicazione di una macro scritta in Visual Basic, riuscire ad identificare quegli ioni presenti in ogni spettro con una buona intensità relativa. In questo modo si può verificare in tempi molto veloci quali picchi corrispondono effettivamente a dei singoli ioni e quali invece a degli aggregati. I valori  $m/z$  non corrispondenti ad aggregati possono essere utilizzati per lo studio di spettrometria di massa tandem.

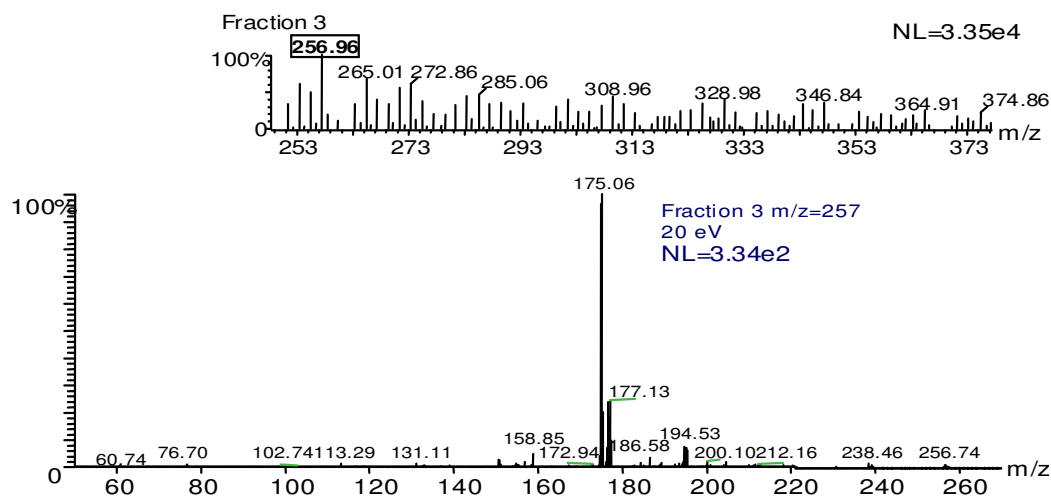
Nelle figure che seguono sono riportati alcuni spettri di frammentazione degli ioni individuati con questa tecnica. Dagli spettri di frammentazione, tuttavia, non è



possibile risalire in maniera inequivocabile alla molecola originale. Anche se lo ione scelto per la frammentazione non rappresenta un aggregato, ad ogni valore  $m/z$  possono comunque corrispondere più molecole con lo stesso peso molecolare nominale (McIntyre, 2001). Quindi la frammentazione può interessare molecole di natura diversa che, frammentate contemporaneamente, forniscono uno spettro massa-massa di difficile interpretazione. Tuttavia, è possibile verificare che alcuni frammenti sono comuni a vari spettri di frammentazione e sono identificabili dei segnali corrispondenti alla perdita di molecole d'acqua rispetto allo ione molecolare  $[M-18]^-$ . La presenza di frammenti comuni a più spettri può dare indicazioni relative alla presenza di serie omologhe, e, inoltre, le perdite di massa individuate indicano che gli ioni selezionati per la frammentazione sono a singola carica, altrimenti si sarebbero dovuti individuare frammenti a  $[M-(18/z)]^-$  con  $z > 1$ .



**Figura 7.8** Spettro ESI-MS/MS dello ione  $m/z = 267$  ottenuto con energia di collisione di 20 eV. In alto l'intervallo 264-364 dello spettro ESI-MS della frazione acquosa ottenuta dopo transesterificazione della Frazione 3 dal quale è stato selezionato lo ione frammentato.



**Figura 7.10** Spettro ESI-MS/MS dello ione  $m/z = 257$  ottenuto con energia di collisione di 20 eV. Inserito l'intervallo 264-364 dello spettro ESI-MS della Frazione 3, dal quale è stato selezionato lo ione frammentato.

## CAPITOLO 8

### CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN COMPOST E DI SUE

#### FRAZIONI A DIFFERENTE POLARITÀ

##### 8.1 Introduzione

Negli ultimi anni, le implicazioni ambientali nel settore produttivo in agricoltura richiedono cambiamenti nel management del suolo, per cui sono sempre più incoraggiate pratiche in cui il materiale organico di riciclo da biomasse migliori le condizioni fisiche e chimiche del suolo e renda l'agricoltura più sostenibile. Rifiuti organici trattati (compost) sono ampiamente utilizzati per migliorare la qualità dei suoli, oltre che per superare il problema dello smaltimento dei rifiuti. Il maggior vantaggio

degli ammendamenti con compost risiede nel miglioramento a lungo termine delle proprietà chimiche e fisiche attraverso un accumulo di materia organica.

La composizione della materia organica nei materiali di rifiuto come i compost è molto complessa, così come nei suoli, per la presenza di un ampio spettro di composti chimici e la varietà di prodotti decomposti e sintetizzati. Di conseguenza una caratterizzazione molecolare di questi materiali è difficile da ottenere, senza una separazione di frazioni più omogenee da analizzare con metodi chimici e chimico-fisici. Il frazionamento della sostanza organica utilizzato in questa tesi per i campioni unici, che non comporta una sostanziale alterazione chimica dei suoi componenti, accoppiato a metodi spettroscopici di indagine strutturale, può provvedere informazioni sull'intero campione di materiale e contribuire ad una migliore comprensione delle caratteristiche complessive.

L'obiettivo del lavoro illustrato in questo capitolo è, perciò, di ottenere informazioni sulla composizione di un compost derivato da rifiuti urbani e delle sue frazioni a diversa polarità descritte nel capitolo 3 (Materiali e Metodi), indicate come TEA, HiDOM e HoDOM. Nello studio di queste frazioni, ci si è limitati alla caratterizzazione mediante GC/MS delle frazioni organiche ottenute mediante frazionamento chimico sequenziale. Anche se le molecole alchiliche costituiscono solo una minore frazione della materia organica, è stato dimostrato che esse giocano un ruolo essenziale nell'accumulo e la stabilizzazione della SOM (Augris *e al.*, 1998). L'identificazione di composti idrofobici è stata utilizzata per valutare processi diagenetici nei sedimenti di ambienti marini e terrestri (Tegelaar *e al.*, 1995), modificazione dei tessuti delle piante, lettiera (Tegelaar *e al.*, 1993), materia organica persistente nei suoli (Riederer *e al.*, 1993; Naafs *e al.*, 2004). Inoltre, come visto nei

precedenti capitoli, lo studio di queste frazioni fornisce informazioni che sono specifiche della sostanza studiata, permettendo di distinguere le caratteristiche dei diversi campioni.

Per uno studio più dettagliato sono presentati anche i dati ottenuti mediante spettroscopia CPMAS-<sup>13</sup>C-NMR del Compost e delle sue frazioni a diversa polarità.

## 8.2 Analisi NMR

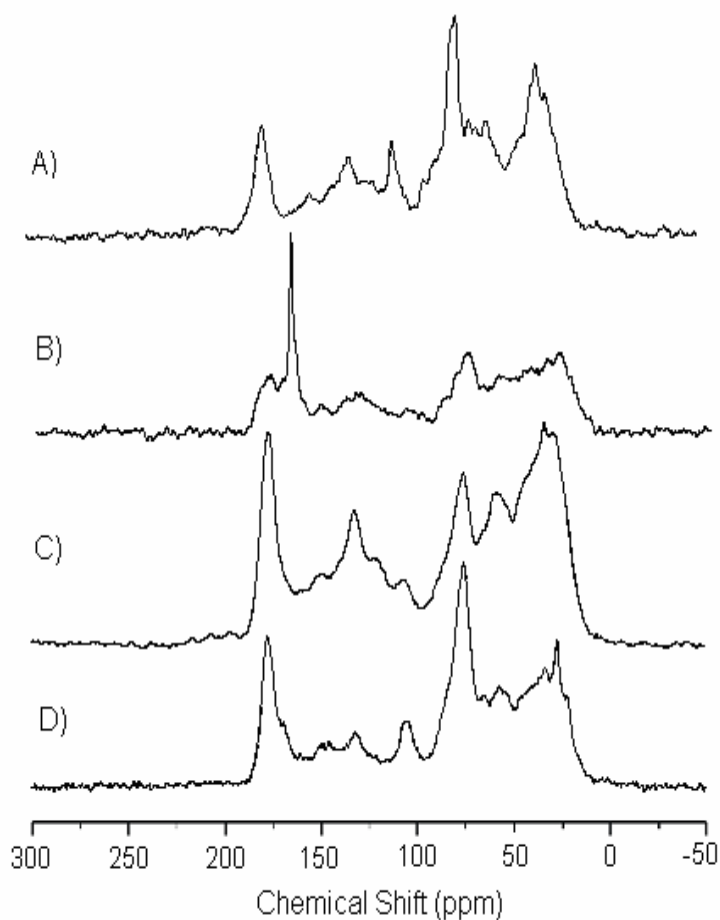
Le informazioni spettrali ottenute dagli spettri CPMAS-NMR (Fig.8.1) dei differenti materiali sono illustrati in Tabella 8.1. L'assegnazione degli intervalli spettrali alle varie tipologie di carbonio è la stessa illustrata nel capitolo 4.

Il segnale nell'intervallo assegnato ai carboni alchilici (0-50 ppm) costituisce circa il 30 % di ciascun campione ed è il più importante segnale per tutti gli spettri, eccetto che per il campione TEA. La regione spettrale assegnata ai carboidrati (71-110), invece, è molto importante sia per il Compost tal quale che per l'HiDOM, mentre per l'HoDOM l'integrazione su questo intervallo dà il valore più basso.

**Tabella 8.1** Distribuzione di carbonio (%) nelle regioni spettrali degli spettri CPMAS-<sup>13</sup>C-NMR del compost e delle sue frazioni a diversa polarità.

Campione	0-50	50-71	71-110	110-167	167-192	192-230	HI/HB <sup>a</sup>
Compost	31	17	21	23	8	0	0.85
TEA	28	14	16	25	16	1	0.89
HoDOM	31	14	14	27	12	1	0.71
HiDOM	32	13	21	14	14	5	1.16

a. Rapporto carboni idrofilici/carboni idrofobici = [(50-110)+(160-230)]/[(0-50)+(100-160)]



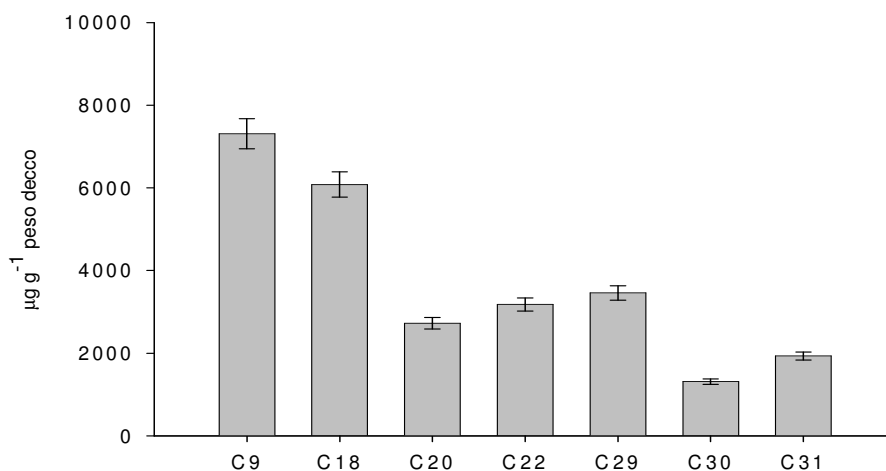
**Figura 8.1** Spettri CPMAS- $^{13}\text{C}$ -NMR di: A) Compost, B) TEA, C) HoDOM, D) HiDOM.

L'area della regione spettrale assegnata agli aromatici fornisce valori simili ma decrescenti nell'ordine: HoDOM>TEA>Compost, mentre per l'HiDOM l'importanza percentuale di questa regione spettrale è molto più bassa. L'area assegnata ai carboni carbossilici è maggiore nel TEA ed ha valori più bassi per il Compost, mentre HiDOM e HoDOM presentano valori simili leggermente al di sotto del TEA. Infine il rapporto HI/HB, definito nel capitolo 4 indica, come atteso, che l'HiDOM è la più idrofilica di tutte le frazioni, mentre l'HoDOM è la più idrofobica. Il TEA ed il compost invece hanno un valore simile del rapporto HI/HB.

## 8.2 Componente lipidica libera

Le classi di composti rilasciati come componente libera dal Compost e dalle sue frazioni a diversa polarità, le rese di estrazione, gli intervalli dimensionali e gli omologhi dominanti sono mostrati in Tabella 8.2. Le classi di molecole più abbondanti nel Compost sono, nell'ordine: acidi alifatici  $\alpha,\omega$ -dicarbossilici, acidi monocarbossilici, alcoli, alcani, composti aromatici e minori quantità di steroidi e terpenoidi.

Gli acidi  $\alpha,\omega$ -alcandioici sono stati trovati in larga quantità tra la componente libera del Compost, con una chiara predominanza degli omologhi a lunga catena ( $>C_{18}$ ). In Figura 8.2 sono riportate le distribuzioni dei dioici estratti dal Compost come composti non legati alla matrice umica.



**Figura 8.2** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$ ) e distribuzione degli acidi  $\alpha,\omega$ -alcandioici analizzati nell'estratto in solventi organici del Compost.

Questi composti costituiscono la maggiore componente dei domini alifatici delle suberine (Kolattukudy, 1980a; Matzke and Riederer, 1991; Riederer et al., 1993). La loro dominanza rispetto ai di- e tri-idrossiacidi riflette un maggior contributo dalle suberine rispetto alle cutine nella formazione di questo Compost.

**Tabella 8.2** Rese ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso secco) e composizione<sup>a</sup> degli estratti in solventi organici dal compost e dalle sue frazioni a diversa polarità

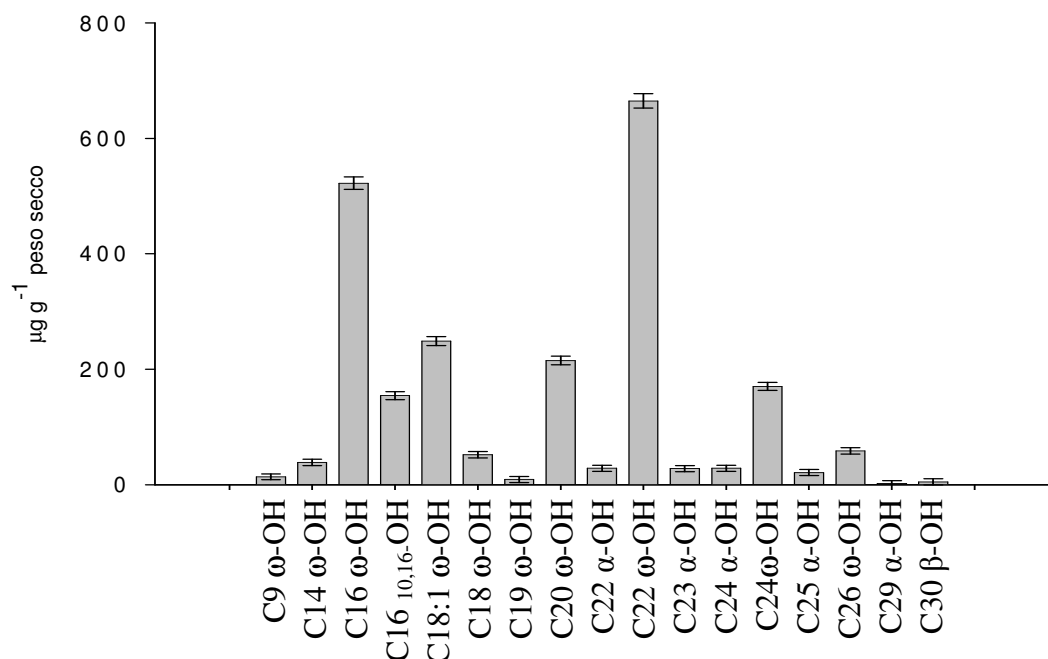
<b>Composti</b>	<b>Compost</b>	<b>TEA</b>	<b>HoDOM</b>	<b>HiDOM</b>
Acidi $\alpha,\omega$ -alcandioici	21100	-	-	-
Acidi <i>n</i> - alcanoici insaturazione%	8050 (C <sub>22</sub> ,C <sub>24</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>30</sub> 35	43590 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub> 24	10990 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub> 29	27510 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub> 25
Alcoli	6840 (C <sub>24</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	5950 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	-	5850 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>
Alcani	1400	8140	90	2430
Carboidrati	10	1660	19040	1510
Di-, tri-idrossiacidi	410	-	180	380
$\omega$ -idrossiacidi	1750	-	1170	-
$\alpha,\beta$ -idrossiacidi	180	-	10	30
Composti aromatici	5120	1370	1380	-
Steroidi	690	-	650	660
Diterpenoidi	1490	4670	490	950

a. Intervallo da Ci a Cj; in parentesi gli omologhi dominanti

Infatti, in letteratura è riportato che i domini alifatici delle suberine è dominato dagli acidi  $\alpha,\omega$ -dioici e dagli  $\omega$ -idrossiacidi (Bernards e Lewis, 1998), mentre gli acidi idrossialcanoici funzionalizzati al centro della catena sono i maggiori componenti delle cutine (Kolattukudy, 1980a; Holloway, 1982; Ryser and Holloway, 1985; Matzke and Riederer, 1991).

Anche gli  $\omega$ -idrossiacidi sono stati trovati in maggiore quantità rispetto ai di- e tri- idrossiacidi, a conferma di quanto sopra riportato. Per gli  $\omega$ -idrossiacidi gli omologhi individuati vanno dal  $C_{16}$  al  $C_{26}$  con massimo in  $C_{16}$  e  $C_{22}$ , con una forte predominanza degli omologhi a numero pari di carboni. Inoltre, è stato identificato anche l'acido  $\omega$ -idrossioctadecenoico ( $\omega$ - $C_{18:1}$ ), sebbene in letteratura sia riportato che questo composto, uno dei maggiori costituenti delle suberine nelle radici delle querce, è velocemente degradato (Nierop et al., 2003; Naafs 2004). Al contrario, nei campioni di compost ne è stata trovata una quantità significativa, oltre alla identificazione dell'acido  $\alpha,\omega$ -nonadioico, che è considerato un suo derivato (Naafs 2004). Tra i di- e tri-idrossiacidi sono identificate solo piccole quantità del 9,16- e il 10,16-diidrossiesadecanoico. In Figura 8.3 sono riportati gli idrossiacidi estratti in solventi organici dal Compost. I monoacidi alifatici identificati negli estratti organici del compost sono dominati da una distribuzione bimodale (Figura 8.4). Le componenti a catena corta ( $<C_{20}$ ) sono caratterizzate dagli acidi  $C_{16}$  e  $C_{18}$ , mentre quelle a lunga catena sono dominate dai termini  $C_{22}$  e  $C_{24}$ , suggerendo ancora un input derivante maggiormente dalle suberine.





**Figura 8.3** Concentrazione (µg/g) e distribuzione degli idrossiacidi analizzati nell'estratto in solventi organici del Compost.

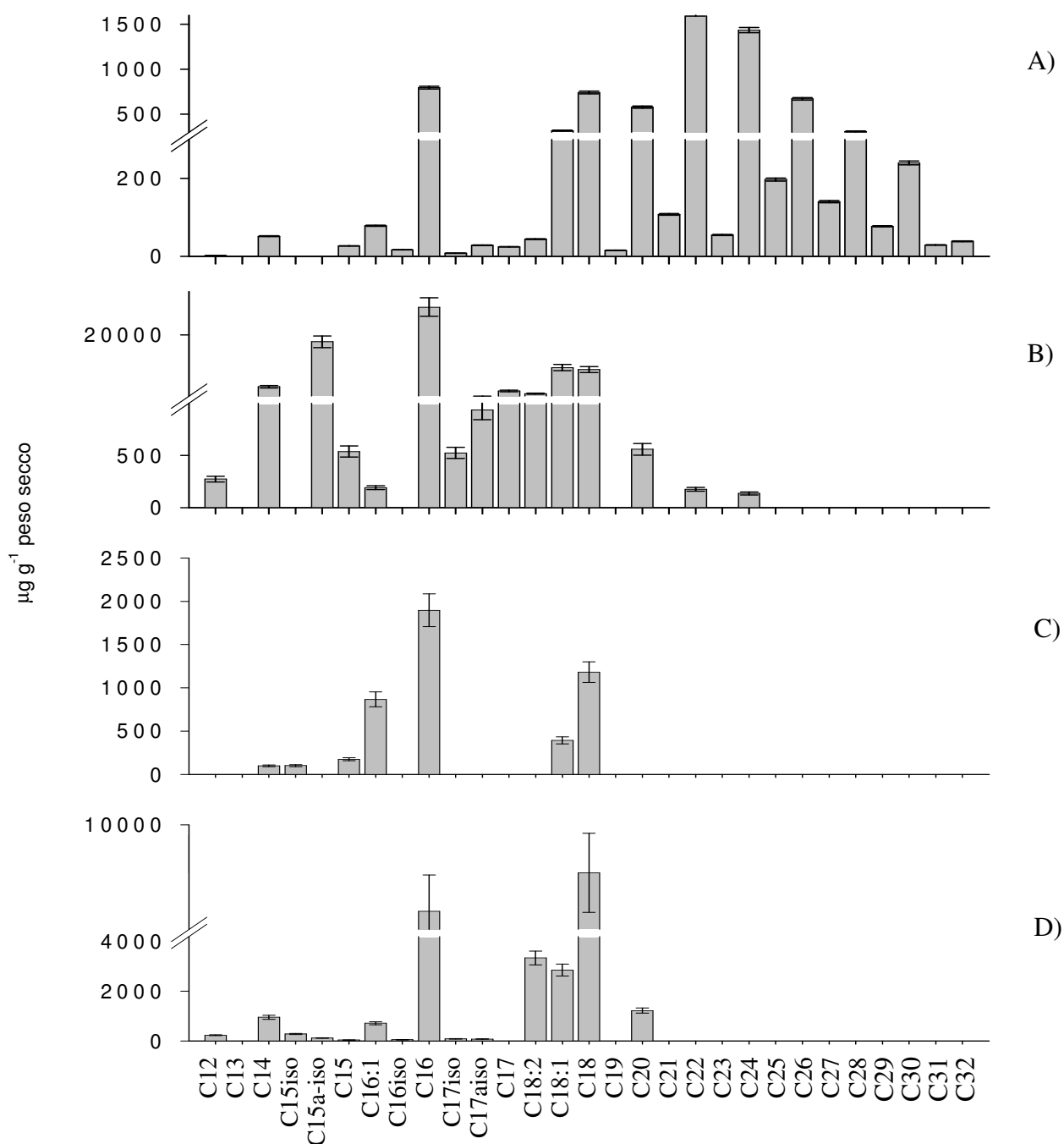
Un contributo minore viene dagli acidi grassi insaturi, i quali sebbene siano comunemente dominanti nei vegetali superiori, sono in quantità minore rispetto all'acido saturo C<sub>18</sub>, come già notato per i campioni umici, a causa dell'ossidazione dei doppi legami dovuta a degradazione batterica, come suggerito dalla presenza degli acidi *iso* e *anteiso* C<sub>15</sub> e C<sub>17</sub>.

Altri composti identificati in concentrazione relativamente minore includono gli *n*-alcanoli (C<sub>10</sub>-C<sub>28</sub>), con una forte predominanza degli omologhi pari rispetto ai dispari e gli *n*-alcani (C<sub>23</sub>-C<sub>33</sub>), con massimo a C<sub>31</sub> e con una forte predominanza degli omologhi dispari su quelli pari. La prevalenza delle componenti a catena lunga in entrambi le classi di composti e le distribuzioni degli omologhi (Figure 8.5-6 ), ancora suggeriscono un contributo dai vegetali superiori.

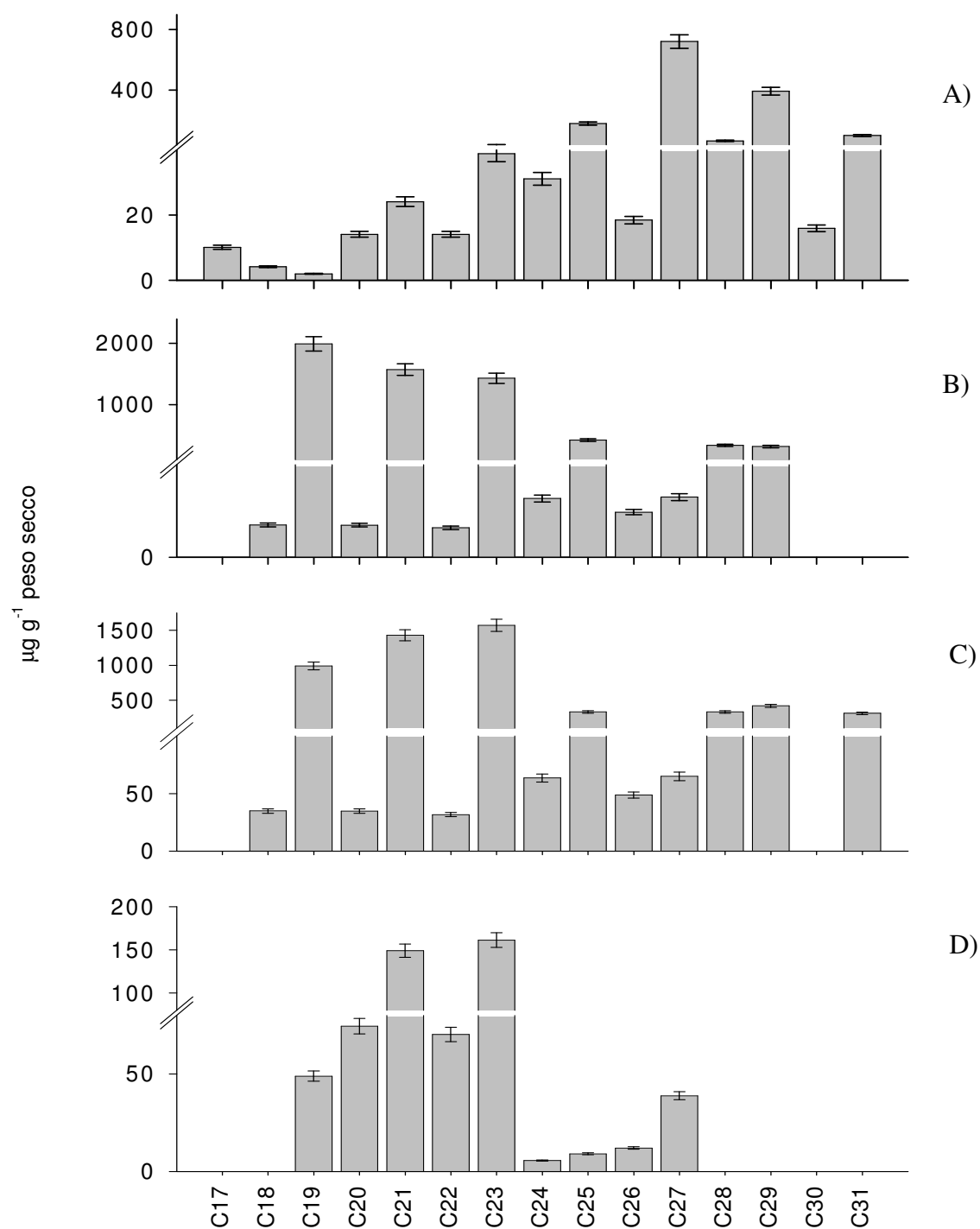
Nel TEA di compost, invece, si osserva una chiara perdita delle componenti derivanti dalla suberina, infatti sia gli acidi  $\alpha,\omega$ -alcandioici che gli  $\omega$ -idrossiacidi non sono identificati, inoltre gli acidi *n*-alcanoici sono identificati in uno spettro di omologhi inferiore C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>, con una prevalenza degli omologhi pari sui dispari e degli omologhi a catena corta su quelli a catena lunga.

Anche l'HoDOM e l'HiDOM rilasciano gli acidi *n*-alcanoici in un piccolo intervallo C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>, con una prevalenza degli omologhi a catena corta, ma è comunque possibile identificare alcuni  $\omega$ -idrossiacidi (C<16) e alcuni  $\alpha,\omega$ -alcandioici (C<12) di probabile origine batterica, sebbene in quantità esigue rispetto al compost. Inoltre, sono stati identificati nell'HoDOM e nell'HiDOM una grande quantità di prodotti derivanti da monosaccaridi come D-ribosio, D-glucosio, D-mannosio, D-xylosio, D-galattosio, L-arabinosio, come monosaccaridi, come glicosidi per-sililati, e come acidi deossialdonici trisililati lattoni (Capitolo 5, par.5.2.3). Piccole quantità di  $\beta$ -sitosterolo e di acido deidroabietico sono state identificate nel Compost, mentre una quantità molto maggiore di acido deidroabietico è stata osservata nel TEA, associata all'ampio picco osservabile ad un tempo di ritenzione di 30.51 min (Figura 13A,B). L'acido deidroabietico è un diterpenoide polare, che si è evidentemente ripartito nel TEA rispetto al compost. Un più ampio numero di steroidi e terpenoidi sono ritrovati negli estratti organici dell'HiDOM e dell'HoDOM, sebbene la loro concentrazione sia più bassa rispetto a quelle ritrovate nel TEA. Oltre al sitosterolo e all'acido deidroabietico i composti identificati mediante confronto con la libreria NIST-MS, sono il 15-isobutil-(13 $\alpha$ )-isocopalane; l'acido 5. $\beta$ -podocarpa-8,11,13-trien-16-oico; l'acido isopimarico; l'acido 5. $\beta$ ., 9. $\beta$ .H, 10. $\alpha$ .-labd-8(20)-ene-15,19-dioico, e lo stigmasterolo. Anche i composti

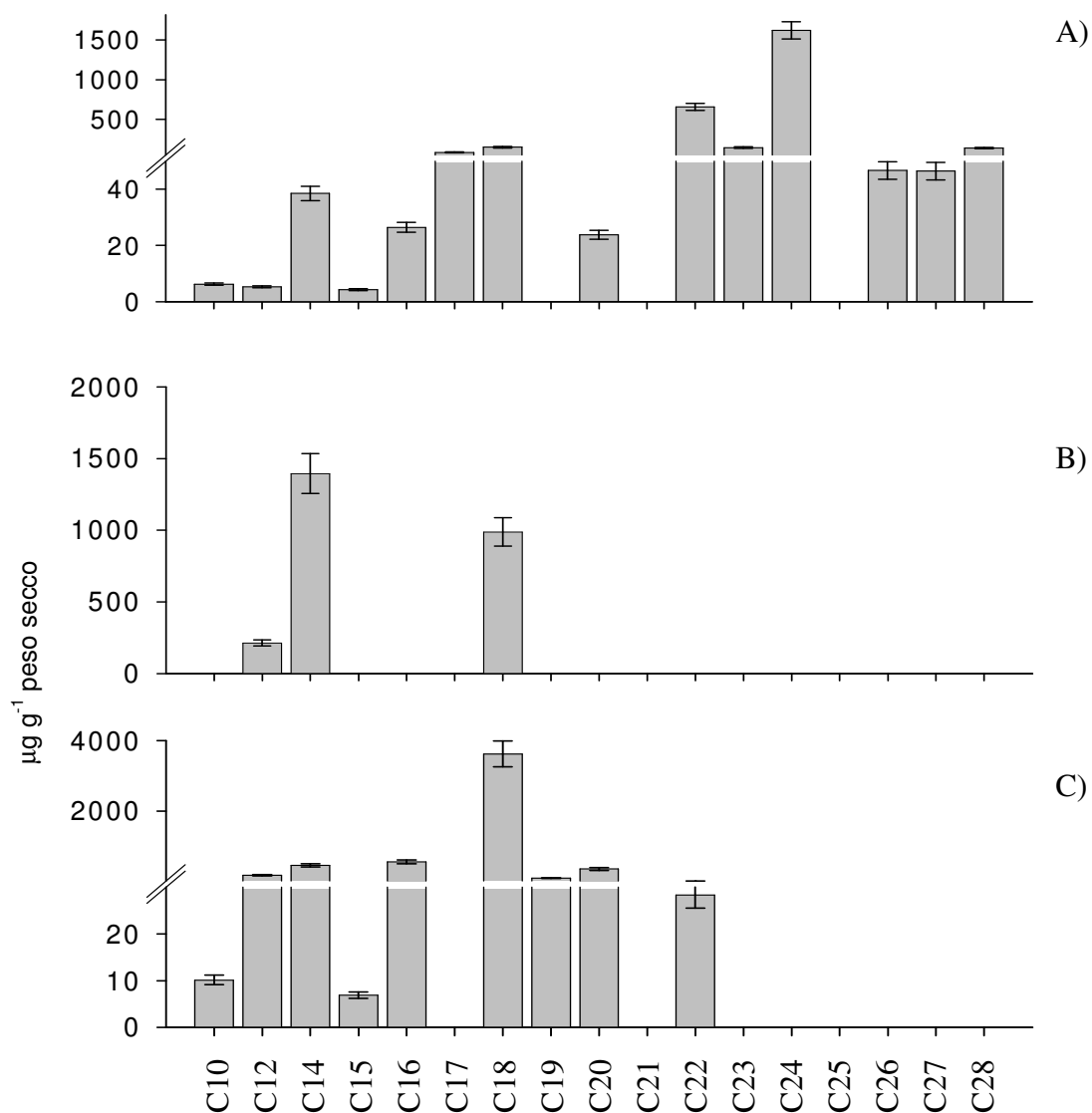
aromatici costituiscono una percentuale apprezzabile di componente libera, tuttavia questi sono rilasciati in maggiore quantità dopo transesterificazione.



**Figura 8.4** Concentrazione (µg/g) e distribuzione degli acidi alcanoici analizzati negli estratti organici di : A) Compost, B) TEA, C) HoDOM, D) HiDOM.



**Figura 8.5** Concentrazione (µg/g) e distribuzione degli *n*-Alcani negli estratti organici di : A) Compost, B) TEA, C) HoDOM, D) HiDOM.



**Figura 8.6** Concentrazione (µg/g) e distribuzione degli Alcoli negli estratti organici di: A) Compost, B) TEA, C) HiDOM.

### 8.3 Componente identificata dopo transesterificazione e dopo metanolisi.

Le classi di composto rilasciate da ciascun campione dopo transesterificazione e dopo metanolisi, le rese di estrazione, gli intervalli dimensionali e gli omologhi dominanti sono mostrati in Tabella 8.3.

I composti più abbondanti rilasciati dal Compost sia dopo transesterificazione che dopo metanolisi sono i composti aromatici. Le quantità di molecole aromatiche rilasciate dal

**Tabella 8.3** Rese ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  peso secco) e composizione<sup>a</sup> delle maggiori classi di composti rilasciate dopo transesterificazione e dopo metanolisi alcalina.

Composti	Compost		TEA		HoDOM		HiDOM
	DL <sup>b</sup>	FL <sup>c</sup>	DL	FL	DL	FL	DL.
Acidi $\alpha,\omega$ -alcandioici	20110	0.0	310	70	-	-	530
Acidi <i>n</i> -alcanoici insaturazione%	4510 (C <sub>22</sub> ,C <sub>24</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>30</sub> 35	2200 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub> 27	10140 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub> 0.02	470 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub> 32	1350 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub> 29	510 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub> 51	730 (C <sub>16</sub> ,C <sub>18</sub> ) C <sub>9</sub> -C <sub>28</sub> 0.01
Alcoli	1020 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	1100 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	390 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	60 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	203 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	80 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>	130 (C <sub>18</sub> ) C <sub>12</sub> -C <sub>26</sub>
Alcani	2040	10	260	40	210	20	590
Carboidrati	1200	-	470	20	1350	230	120
Di-, tri-idrossiacidi	2580	-	130	-	20	0	-
$\omega$ -idrossiacidi	1050	-	-	-	50	0	-
$\alpha,\beta$ -idrossiacidi	340	-	-	-	540	0	-
Composti aromatici	81490	1070	140	20	580	30	60
Steroidi	2350	120	-	-	50	50	160
Diterpenoidi	0.0	260	310	40	-	-	-

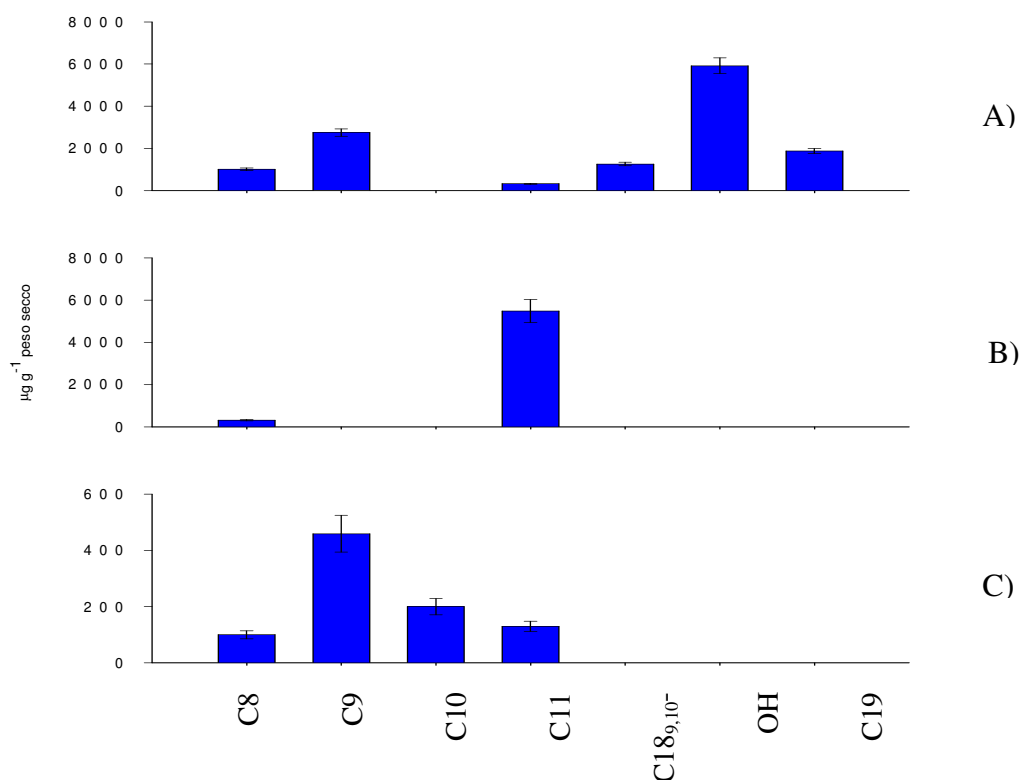
a. Intervallo da Ci a Cj; in parentesi gli omologhi dominanti

b. Componenti debolmente legate alla matrice umica analizzate negli estratti organici dopo transesterificazione.

c. Componenti fortemente legate alla matrice umica analizzate negli estratti organici dopo metanolisi.

TEA, dall'HoDOM e dall'HiDOM sono invece molto inferiori. Essi sono gli stessi prodotti già identificati nello studio dei campioni umici, cioè prodotti derivanti dai domini aromatici delle suberine come l'acido 3-fenilprop-2-enoico metil estere, con 1 o 2 gruppi metossilici (acidi p-coumarico e ferulico), e gli acidi mono, di e tri-metossibenzoici derivanti dalla lignina. Gli stessi composti sono rilasciati dopo la transesterificazione degli altri materiali studiati, ma le loro concentrazioni sono molto più basse e il numero di composti identificati è più ristretto. Generalmente la metanolisi alcalina rilascia minori quantità di composti aromatici per ciascun campione, indicando che i prodotti derivati dalla lignina e dalla suberina sono legati alla matrice umica preferenzialmente per mezzo di legami esterei più accessibili alla transesterificazione. Tuttavia, una percentuale molto importante di composti aromatici è stata rilasciata dal compost ancora dopo metanolisi.

Gli acidi dioici sono stati trovati ancora in larga quantità nel Compost dopo transesterificazione, ma con una piccola diminuzione degli omologhi a lunga catena (Figura 8.7), mentre essi sono stati individuati solo in traccia dopo metanolisi. Anche gli omologhi a catena lunga degli  $\omega$ -idrossiacidi decrescono dopo transesterificazione. Tra di essi l'omologo più importante è risultato il C<sub>16</sub>  $\omega$ -idrossiacido (Figura 8.8). Una maggiore quantità e un più ampio numero di acidi di e tri-funzionalizzati sono stati trovati dopo transesterificazione del Compost. Tra questa classe di composti, gli acidi isomeri 9,16- e 10,16-diidrossiesadecanoici sono risultati i più abbondanti, seguiti dagli acidi 9,10-epossi -18- idrossi- e- 9,10,18-triidrossioctadecanoici. L'ultimo composto può anche derivare dall'idrolisi del corrispondente epossido C<sub>18</sub>, che rimane inalterato dopo transesterificazione. Infatti, una possibile modificazione dell'eossido per transesterificazione può produrre maggiormente due isomeri: l'acido 9,18-diidrossi-10-

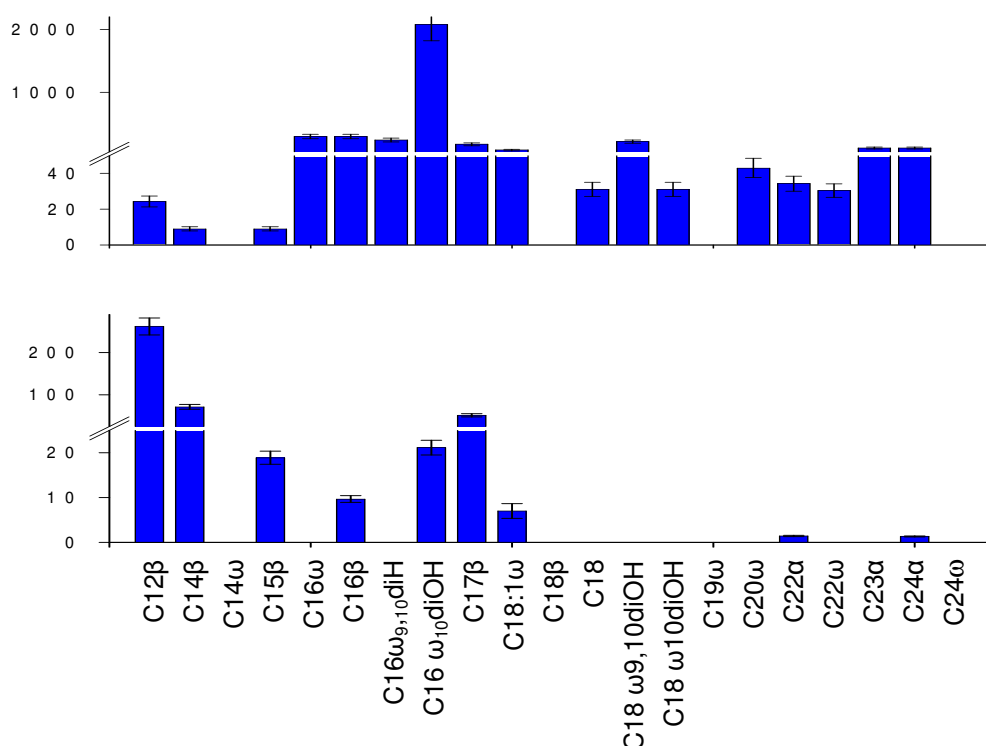


**Figura 8.7** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$ ) e distribuzione degli acidi  $\alpha,\omega$ -alcandioici negli estratti organici dopo transesterificazione di : A) Compost, B) TEA, C) HiDOM.

metossioctadecanoico metil estere e l'acido 10,18-diidrossi-9-metossioctadecanoico metil estere (Kolattukudy *et al.*, 1975). Al contrario l'apertura dell'anello epossidico dovuto all'idrolisi alcalina porta alla formazione dell'isomero triidrossiacido. Anche questi composti non sono stati rilasciati dopo metanolisi. L'acido  $\omega$ -C<sub>18:1</sub> insieme ad altri  $\omega$ -idrossiacidi a lunga catena e, in minore quantità, gli acidi C<sub>18</sub>-C<sub>28</sub>  $\alpha,\omega$ -dioici, sono stati rilasciati più facilmente dalle strutture dei biopolimeri rispetto ad altre unità alifatiche legate mediante legami esterei (Lopes *et al.*, 2000; Nierop *et al.*, 2003; Naafs, 2004), incluso il C<sub>16</sub>  $\omega$ -idrossiacido. Questi composti sembrano formare una parte più accessibile dei biopolimeri e possono essere rilasciati dalle idrolisi che si verificano naturalmente nei suoli o durante le procedure di compostaggio, ed essere perciò presenti nella matrice del compost più come composti liberi che come composti debolmente



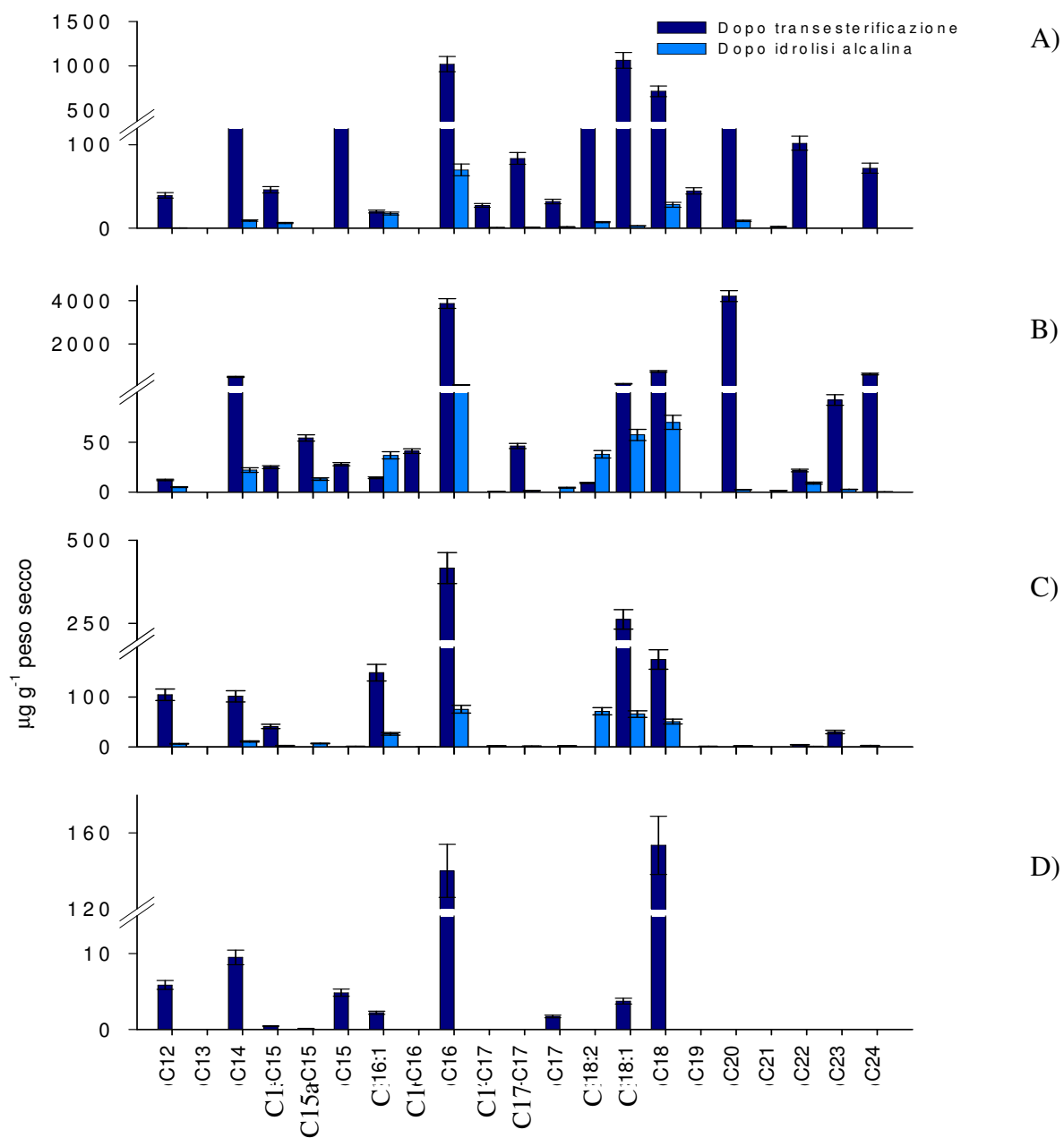
legati. Invece, i di e tri- idrossi acidi, oltre che il C16  $\omega$ -idrossiacido (Ray e Stark, 1998), sono meno suscettibili all'idrolisi, facendo parte del cuore della struttura dei biopolimeri come suggerito da Nierop *et al.*, (2003), e, probabilmente per questo motivo, sono stati rilasciati solo dopo transesterificazione.



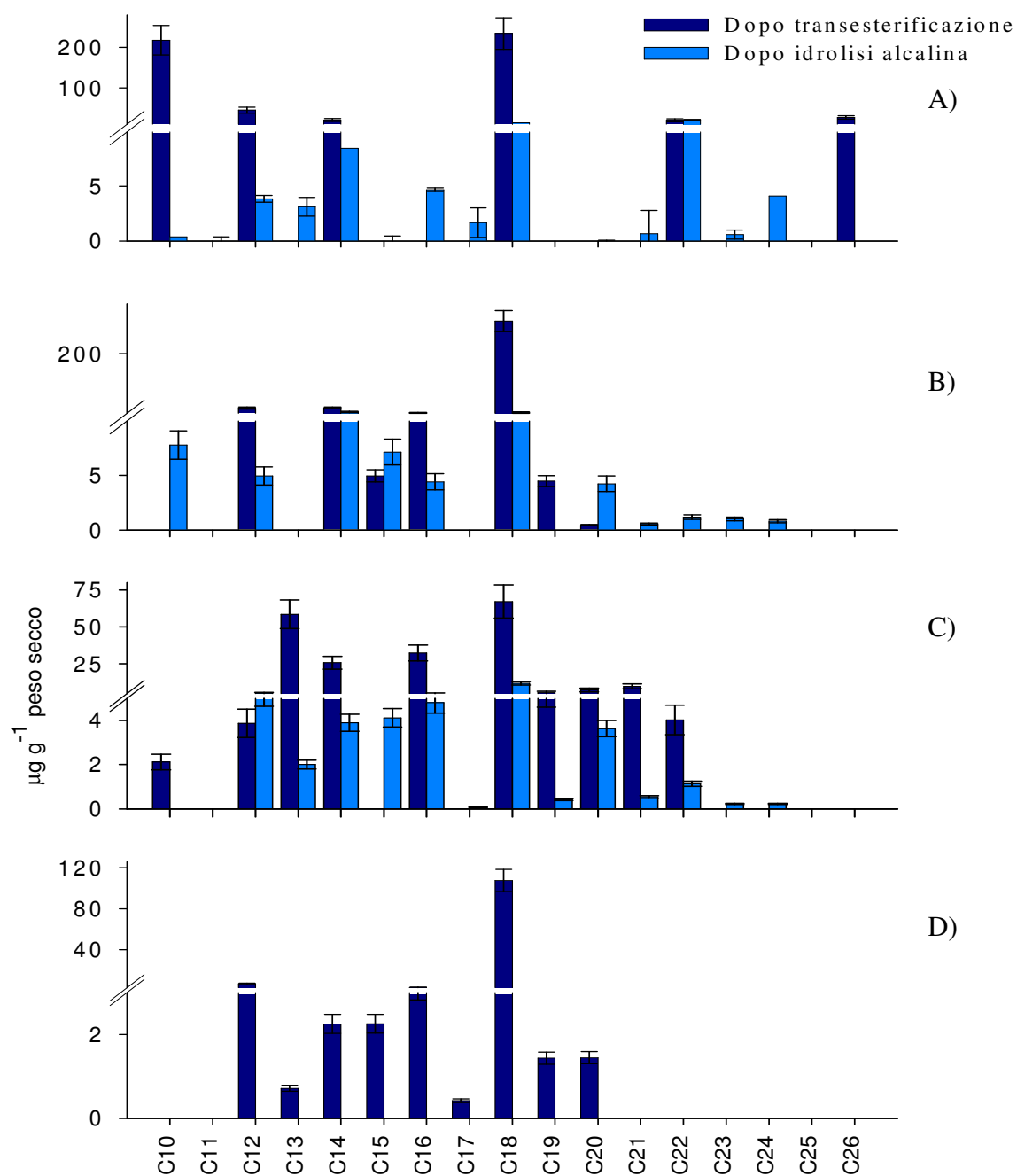
**Figura 8.8** Concentrazione (µg/g) e distribuzione degli Idrossiacidi negli estratti organici dopo transesterificazione di : A) Compost, B) HoDOM

Nelle figure 8.9-11 si riportano le distribuzioni degli acidi alcanoici, degli alcoli e degli alcani rilasciati dopo transesterificazione e metanolisi. Le distribuzioni sono molto simili a quelle osservate per la componente libera, tranne che per una maggiore insaturazione per gli acidi monocarbossilici rilasciati dopo metanolisi.

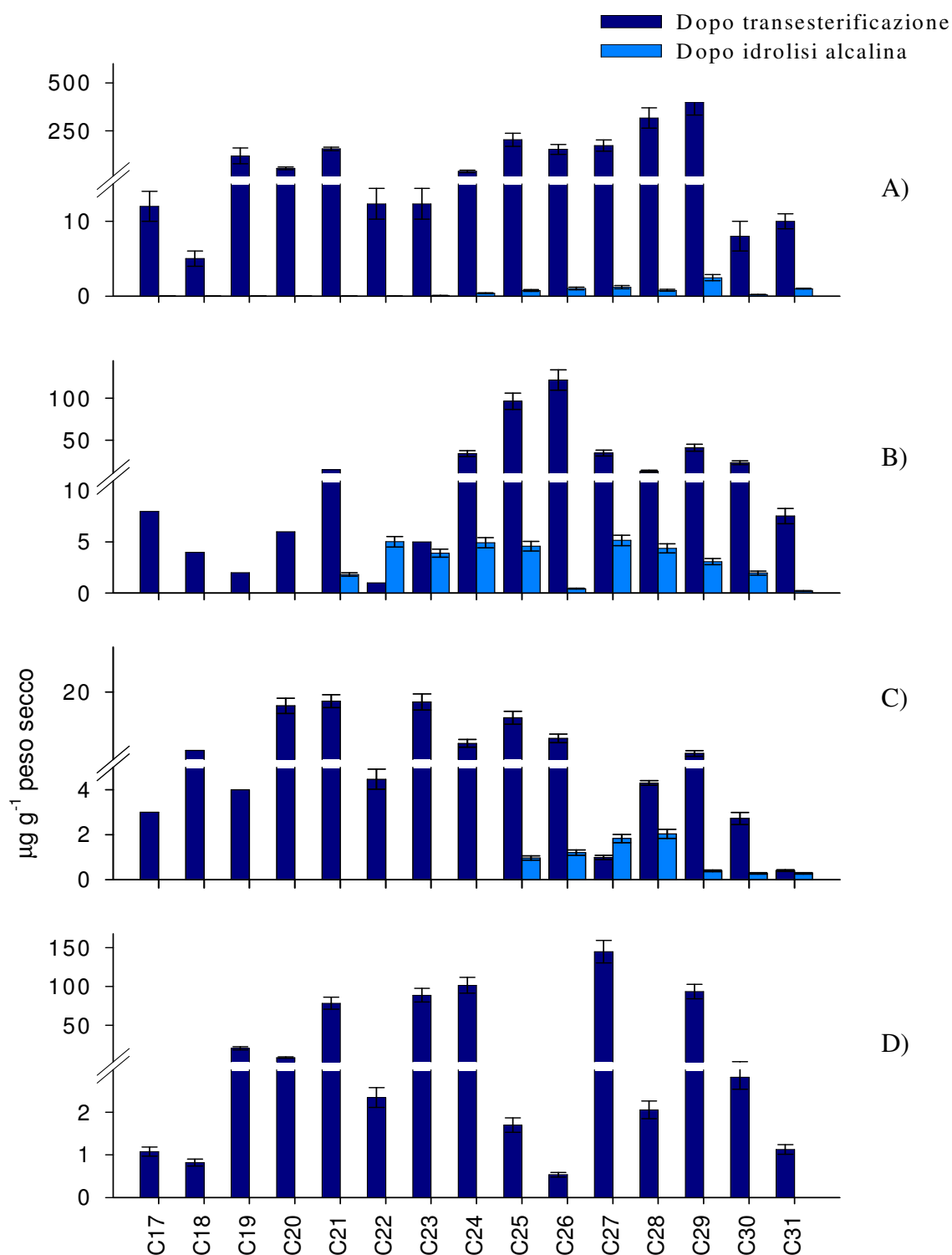
Basse ma significative quantità di steroidi e terpenoidi sono stati rilasciati dalla metanolisi del compost, mentre non sono stati identificati nella componente debolmente legata rilasciata dopo transesterificazione. I composti identificati sono gli stessi individuati dopo transesterificazione. Anche Spaccini e Piccolo (articolo *in press*) hanno osservato l'assoluta similarità degli steroidi e dei terpenoidi ottenuti dopo la metanolisi con quelli ottenuti come componente libera con estrazione in solventi organici. Questi autori hanno suggerito una diretta eredità di questi composti dai corrispondenti omologhi nella componente non legata, per mezzo di una progressiva ripartizione di queste molecole nella complessa matrice idrofobica del compost. Tale protezione idrofobica previene la loro disponibilità diretta nei solventi organici, mentre la loro estrazione diventa possibile solo dopo l'idrolisi alcalina che destruttura i complessi domini protettivi. Queste considerazioni sembrano non essere però valide per le frazioni solubili del compost, dalle quali sono rilasciate alcune quantità di terpenoidi e steroidi anche dopo transesterificazione. In effetti è evidente, come suggeriscono anche le rese totali di estrazione (Tabella 8.5), che non esiste più per queste frazioni di compost una matrice idrofobica protettiva, essendo stato idrolizzato tutto il materiale organico dopo il frazionamento sequenziale. Perciò i meccanismi di protezione ipotizzati, possono esercitarsi sulle frazioni idrosolubili fino a quando la matrice idrofobica non sia totalmente idrolizzata.



**Figura 8.9** Concentrazione (µg/g) e distribuzione degli acidi Alcanoici negli estratti organici dopo transesterificazione di : A) Compost, B) TEA, C) HoDOM, D) HiDOM.



**Figura 8.10** Concentrazione (µg/g) e distribuzione degli Alcoli negli estratti organici dopo transesterificazione di : A) Compost, B) TEA, C) HoDOM, D) HiDOM.



**Figura 8.11** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$ ) e distribuzione degli Alcani negli estratti organici dopo transesterificazione di : A) Compost, B) TEA, C) HoDOM, D) HiDOM.

In Tabella 8.5 sono riportate le quantità in peso del Compost e delle sue frazioni dopo estrazione della componente libera e dopo le reazioni idrolitiche. In Tabella 8.6 invece sono riportate le concentrazioni (mg/g) delle frazioni organiche ed acquose rilasciate dal frazionamento sequenziale. La componente libera è predominante nel TEA rispetto al compost, mentre essa è minore quantità sia nell'HoDOM che nell'HiDOM. I composti debolmente legati, estratti dopo transesterificazione, sono prevalenti nella Frazione organica del Compost, e, in minore quantità, in quella del TEA. La Frazione acquosa dopo transesterificazione invece è maggiore nell'HoDOM. Piccole quantità di materiale organico invece è identificato sia nella Frazione acquosa che in quella organica dell'HiDOM dopo transesterificazione. Una grande quantità di composti è ulteriormente ottenuta dall'idrolisi alcalina del compost, ed è ritrovata solo nella Frazione liposolubile. Minori quantità di composti sono stati ritrovati nel TEA dopo transesterificazione, ma sono egualmente distribuiti nella Frazione acquosa e nella Frazione organica. L'HoDOM produce pochi composti nella Frazione organica, mentre l'HiDOM risulta completamente idrolizzato dopo transesterificazione.

I risultati ottenuti dal frazionamento chimico sequenziale generalmente ben concordano con le caratteristiche dei campioni mostrata dalla spettroscopia CPMAS-NMR. L'HiDOM, con il maggiore carattere idrofilico, mostra anche la minore quantità di materiale identificato per GC-MS, implicando un maggiore contenuto di composti idrofili a basso peso molecolare, come semplici carboidrati e acidi organici. Al contrario, il carattere idrofobico dell'HoDOM è correlato al contenuto della componente libera e dei composti debolmente legati alla matrice del campione.

**Tabella 8.5** Peso secco (mg) del materiale di partenza e dei residui solidi ottenuto dopo i vari passaggi del frazionamento analitico sequenziale

	<b>CL<sup>a</sup></b>	<b>D<sup>b</sup></b>
<b>Compost</b>	69.4	68.7
<b>TEA</b>	68.7	22.3
<b>HoDOM</b>	71.0	2.2
<b>HiDOM</b>	38.4	0.0

a. CL: Residuo dopo estrazione della componente libera

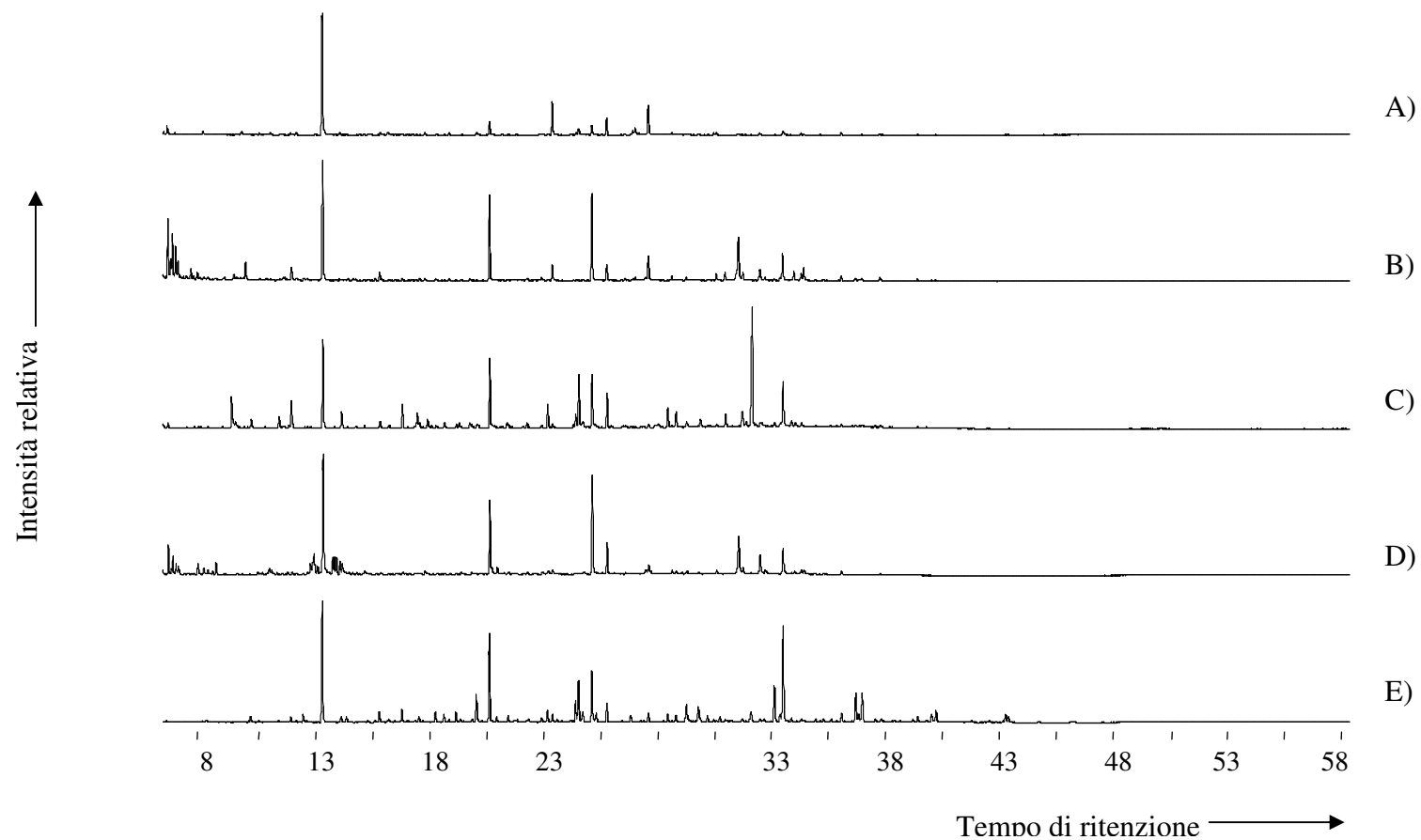
b. D: Residuo dopo transesterificazione e metanolisi

**Tabella 8.6** Resa totale (mg/g) dei prodotti ottenuti nelle frazioni organiche<sup>a</sup> ed acquose<sup>b</sup> dai tre passaggi del frazionamento sequenziale che hanno liberato le componenti libere (CL), le debolmente legate (DL), e le fortemente legate (FL) alla matrice umica

	CL	DL		FL	
Campioni	Organica	Organica	Acquosa	Organica	Acquosa
Compost	47	116.7	34.4	1.8	-
TEA	65.9	12.2	6	0.7	3.1
HoDOM	34.0	4.3	263.1	0.9	-
HiDOM	40.2	2.3	4.8	-	-

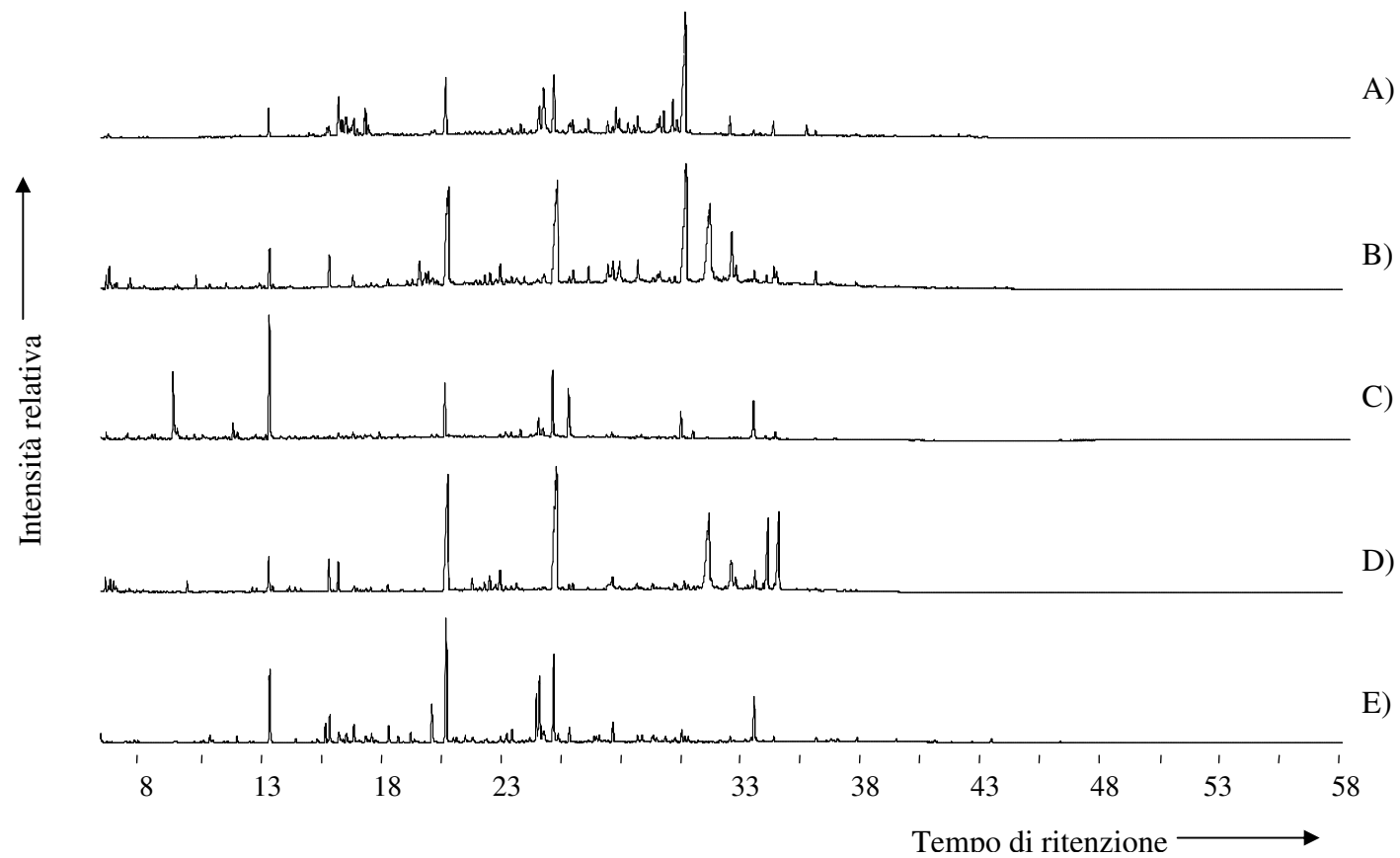
a. Somma delle quantità (mg) dei composti identificati mediante GC/MS normalizzata per i grammi di materiale di partenza.

b. Peso delle frazioni acquose dopo liofilizzazione, normalizzato per i g di materiale di partenza.

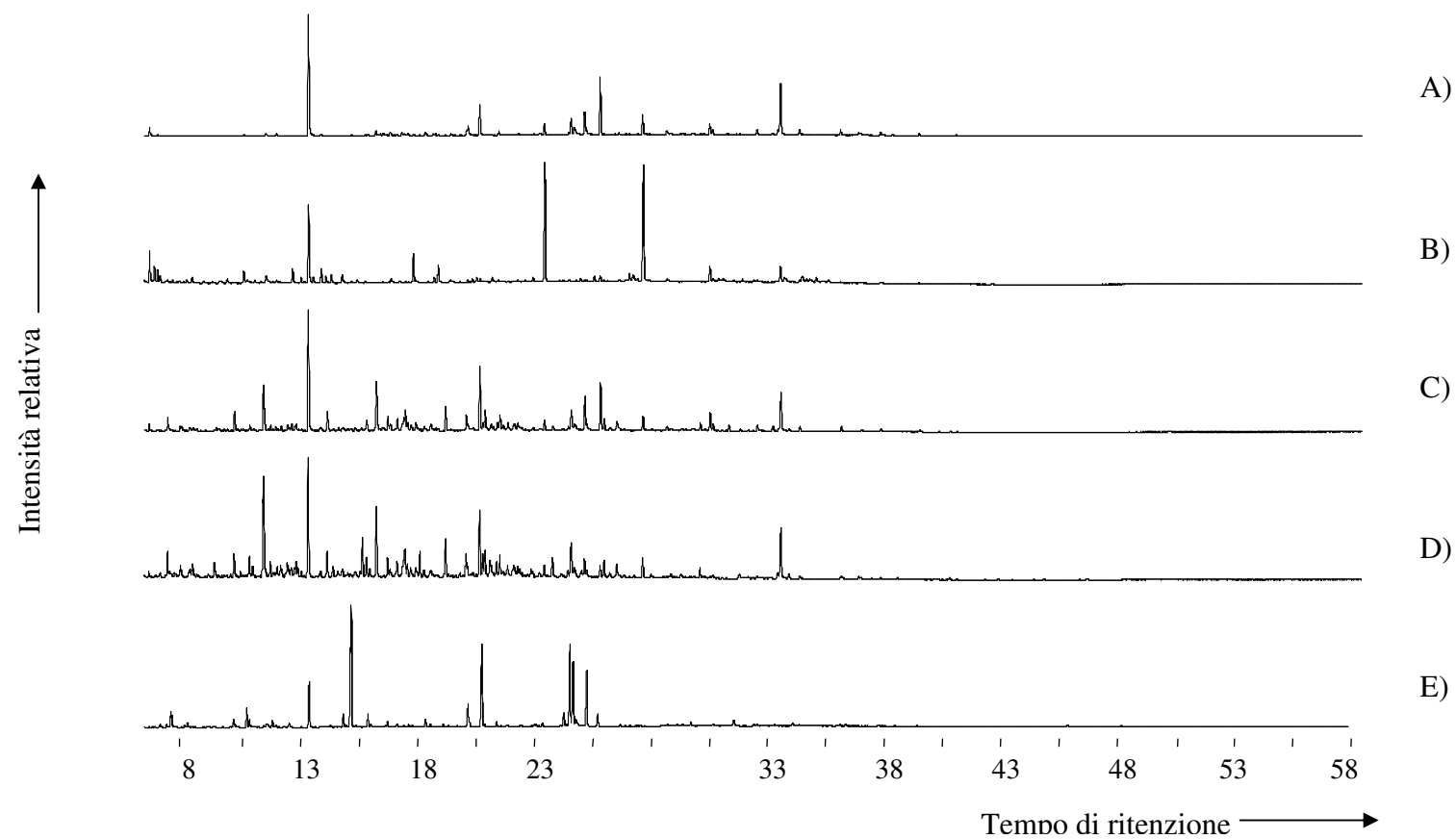


**Figura 8.12** Cromatogrammi ottenuti dagli estratti organici del Compost: A) Frazione neutra delle componenti libere, B) Frazione acida delle componenti libere, C) Frazione neutra delle componenti debolmente legate alla matrice umica, D) Frazione acida delle componenti debolmente legate, E) Componente fortemente legata alla matrice umica.

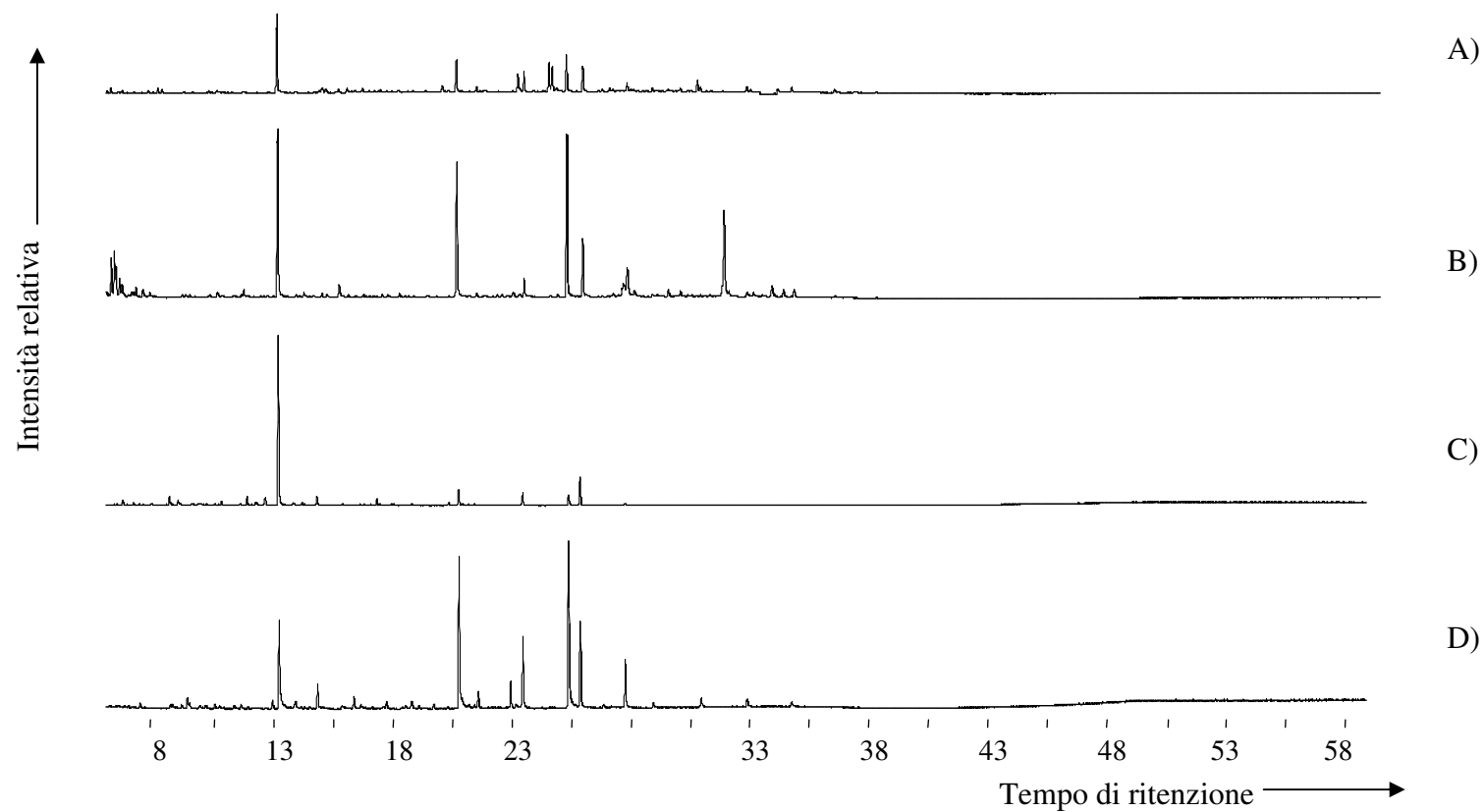




**Figura 8.13** Cromatogrammi ottenuti dagli estratti organici del TEA : A) Frazione neutra delle componenti libere, B) Frazione acida delle componenti libere, C) Frazione neutra delle componenti debolmente legate alla matrice umica, D) Frazione acida delle componenti debolmente legate, E) Componente fortemente legata alla matrice umica



**Figura 8.14** Cromatogrammi ottenuti dagli estratti organici dell'HoDOM : A) Frazione neutra delle componenti libere, B) Frazione acida delle componenti libere, C) Frazione neutra delle componenti debolmente legate alla matrice umica, D) Frazione acida delle componenti debolmente legate, E) Componente fortemente legata alla matrice umica



**Figura 8.15** Cromatogrammi ottenuti dagli estratti organici dell'HiDOM : A) Frazione neutra delle componenti libere, B) Frazione acida delle componenti libere, C) Frazione neutra delle componenti debolmente legate alla matrice umica, D) Frazione acida delle componenti debolmente legate.

## Capitolo 9

### Conclusioni

Da questo lavoro di tesi possiamo desumere due risultati fondamentali che riguardano, il primo, la struttura conformazionale delle sostanze umiche, il secondo, la differente composizione delle frazioni umiche a diverso peso molecolare nominale.

I risultati presentati in questo lavoro di tesi evidenziano che la maggiore omogeneità dimensionale delle frazioni separate per HPSEC ha un'influenza significativa sui legami intermolecolari, tanto da permettere una maggiore resa di estrazione molecolare rispetto a quella ottenuta dall'HA di partenza. Questo risultato si può spiegare con la minore forza di associazione intermolecolare per le frazioni separate, le cui conformazioni permettono una più elevata la superficie di contatto tra le molecole umiche ed il solvente utilizzato per l'estrazione.

Circa la diversa composizione delle frazioni separate per HPSEC preparativa l'indagine è stata condotta con più tecniche sperimentali. Dallo studio NMR è emerso che la Frazione a minore peso molecolare presenta un maggiore contenuto di carboni ossidati (principalmente carboidrati), mentre le frazioni a più alta dimensione molecolare presentano una maggiore percentuale di componenti alifatici ed aromatici. Anche risultati dell'analisi elementare sono in accordo con questa valutazione. Infatti, i rapporti H/C e C/N sono risultati decrescenti all'incrementare dei pesi molecolari nominali denotando un maggior livello di insaturazione e di condensazione, mentre il rapporto O/C è stato crescente con il diminuire del peso molecolare nominale, indicando che le molecole a più basso peso nominale hanno un maggior contenuto di ossigeno.

Le informazioni ottenute dalla caratterizzazione molecolare, sia con le termochemolisi eseguite sui campioni tal quali, sia con il frazionamento analitico sequenziale seguito da indagini cromatografiche e spettroscopiche, hanno consentito di delineare un quadro complessivo della composizione di sostanze umiche, indicando non solo le sue componenti strutturali ma anche il tipo di interazioni intermolecolari nella matrice umica. I risultati ottenuti con le due metodologie, indicano che le sostanze umiche sono costituite da una componente libera, maggiormente alifatica, e da una componente debolmente e fortemente legata, dove è riscontrabile la presenza di una maggiore quantità di composti aromatici nella prima e carboidrati nella seconda. Inoltre dopo transesterificazione si ottiene una quantità significativa di composti idrosolubili dove è possibile riconoscere, mediante termochemolisi, una ampia quantità di prodotti derivanti da materiale proteinaceo o da carboidrati.

Grazie al frazionamento analitico si è osservato che le frazioni separate per HPSEC preparativo non differiscono solo nella composizione, ma anche nel tipo di legame tra i composti identificati e la matrice umica. Così, si è evidenziato che la Frazione 1 e la Frazione 2 sono più ricche di componente lipidica libera rispetto alla Frazione 3, mentre la Frazione 2 è la più ricca di componente debolmente legata alla matrice umica e la Frazione 3 è più ricca di composti fortemente legati. Infine, grazie al frazionamento analitico sequenziale, è stato osservato che la distribuzione delle classi molecolari nelle diverse frazioni dimensionali differisce nella componente libera, nella componente debolmente legata, e nella componente fortemente legata. Ad esempio, è stato evidenziato che i carboidrati sono presenti maggiormente nella componente libera della Frazione 1, sono risultati più numerosi nella componente fortemente legata della Frazione 3. Differenze simili possono essere riscontrate anche per le altre classi di

composti. Questo appare essere di significativa importanza perché indica che metodologie di studio che tentano di caratterizzare le molecole umiche nel loro complesso, fornendo quindi solo informazioni sulla quantità totale di un determinato gruppo funzionale o di un composto, non possono evidenziare differenze dovute al tipo d'interazione intermolecolare. Invece, l'avanzamento della conoscenza in questo complesso campo di ricerca deve riguardare soprattutto la comprensione di queste interazioni.

## **Bibliografia**

- Abe, T., Watanabe, A. X-ray photoelectron spectroscopy of nitrogen functional groups in soil humic acids. *Soil Sci.* 169 (2004) 35-43.
- Almendros G., e Sanz J. Structural study on the soil humin fraction- Boron trifluoride-methanol transesterification of soil humin preparation *Soil Biol.Biochem.*, 23 (1991) 1147-1154
- Almendros, G. e Sanz, J. Structural study on the soil humin fraction-boron trifluoride-methanol transesterification of soil humin preparation. *Soil Biol. Biochem.* 23 (1991) 1147-1154.
- Almendros, G. e Sanz, J. A structural study of alkyl polymers in soil after perborate degradation of humin. *Geoderma.* 53 (1992) 79-95.
- Almendros, G., Guadalix, M.E. Gonzales-Vila, F.J., Martin, F. Distribution of structural units in humic substances as revealed by multi-step selective degradations and <sup>13</sup>C-NMR of successive residues. *Soil Biol.Biochem.* 30 (1998) 755-765
- Almendros, G., e Sanz, J. Compounds released from humic acids upon BF<sub>3</sub>-MeOH transesterification. *Sci. Total Environ.* 81/82 (1989) 51-60.
- Amblès, A., Jambu, P., Parlanti, E., Joffre, J., Riffe, C. Incorporation of natural monoacids from plant residues into a hydromorphic forest podzol. *Eur. J. Soil Sci.* 45 (1994) 175-182
- ANPA - Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente. 2000. Sviluppo di indicatori per il suolo e i siti contaminati. RTI CTN\_SSC 1/2000

- Atalla, R.H. e VanderHart, D.L. The role of solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 15 (1999) 1–19.
- Attinà, E., Nostro, G., Sidari, M., Cacco, G. “Changes in gene structure and its expression induced by humic substances in plant tissues”. First Workshop of International Soil Science Society, Working Group, MO, Canada (1992) 11–15.
- Augris, N., Balesdent, J., Mariotti, A., Derenne, S., e Largeau, C. Structure and origin of insoluble and non-hydrolizable, aliphatic organic matter in a forest soil. *Org. Geochem.* 28 (1998) 119-124
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Ping, X., Vassallo, A.M., e Wilson, M.A Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 16 (1992) 1–42.
- Bayer E., Albert, K., Bergmann, W., Jahns K., Eisener W. e Peters H.K. Aliphatic polyethers, basic building blocks from naturally occurring humic substances: detection by solid state  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie* Edizione Internazionale in Inglese 23(2) (1984) 147-149
- Belzile, N., Joly, H.A., Li, H., Characterization of humic substances extracted from Canadian lake sediments. *Can. J. Chem.* 75 (1997) 14-27.
- Bernards, M.A., Lewis, N.G. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. *Phytochem.* 47 (1998) 915-933
- Bleton, J., Mejanelle, P., Sansoulet, J., Goursard, S., Tchaplal, A., *Journal of Chromatography A*, 720 (1996) 27-49.
- Bottomley, W.B. Some accessory factors in plant growth and nutrition. *Proceedings of the Royal Society of London (Biology)* 88, (1914a) 237–247.
- Bottomley, W.B. Some effects of organic growth-promotion substances (auximones) on the growth of *Lemna minor* in mineral cultural solutions. *Proceedings of the Royal Society of London (Biology)* 89 (1917) 481–505.
- Bottomley, W.B. The significance of certain food substances for plant growth. *Annals of Botany*, (London) 28 (1914b) 531–540.
- Bottomley, W.B. The effect of organic matter on the growth of various plants in culture solutions. *Annals of Botany* (London) 34 (1920) 353–365.

- Brassell S. C., Eglinton G., Maxwell J. R. The geochemistry of terpenoids and steroids. *Biochemical Society Transactions* 11 (1983) 575–586.
- Brown, T. L., Rice, J. A. Effect of experimental parameters on the ESI FT-ICR mass spectrum of fulvic acid. *Anal. Chem.* 72 (2000) 384-390.
- Bruan, V., Halim, M., Amble`s, A. Characterization of the Moroccan Timahdit (X-layer) oil shale kerogen using pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61 (2001) 165–179.
- Bull, I.D., Notta, C.J., van Bergena, P.F., Poultonb, P.R., Eversheda, R.P. Soil Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments - VI. The occurrence and source of organic acids in an experimental grassland soil. *Biology e Biochemistry* 32 (2000a) 1367-1376
- Bull, I.D., van Bergen, P.F., Bull, I.D., Nott, C.J., Poulton, P.R. Evershed, R.P. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments – VI. The occurrence and source of organic acids in an experimental grassland soil. *Soil Biol. Biochem.* 32 (2000b) 1367-1376
- Cacco, G., Attina`, E., Gelsomino, A., Sidari, M. Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* (2000) 163 (2000), 313–320.
- Casenave de Sanfilippo, E., Arguello, J.A., Orioli G.A. The effect of humic acids and their different molecular mass fractions on germination in sunflower. *Biologia plantarum* 32 (1990) 42-48
- Challinor, J.M. Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61 (2001) 3–34.
- Chaminade, R., Boucher, I. Recherches sur la presence de substances rhizogenes dans certains milieux naturels. C.R. Séances Académiques Agriculture Françaises 26 (1940) 66.
- Cheshire, M.V., Cranwell, P.A. e Haworth, R.D. Humic Acid III. *Tetrahedron* 24 (1968) 5155-5167
- Cheshire, M.V., Cranwell, P.A., Falshaw C.P., Floyd, A.J. e Haworth, R.D. Humic Acid-II. Structure of humic acids. *Tetrahedron* 23 (1967) 1669-1682



- Chiavari, G., Galletti, G. C. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of amino acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 1992, 24 (1992), 123-137.
- Clapp, C.E. e Hayes, M.H.B. Sizes and shapes of humic substances. *Soil Sci.* 164 (1999) 777-788
- Conte, P. e Piccolo, A. Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999b) 1682-1690
- Conte, P., Spaccini, R., Piccolo, A. Advanced CPMAS-<sup>13</sup>C NMR techniques for molecular characterization of size-separated fractions from a soil humic acid. *Anal Bioanal Chem* 386 (2006) 382–390
- Cozzolino, A., Conte, P., e Piccolo, A. Conformational changes of soil humic substances induced by some hydroxy-, cheto-, and sulphonic acids. *Soil Biol. Biochem.* 33 (2001) 563-571
- DeJongh, D.C., Radford, T., Hribar, J.D., Hanessian, S., Bieber, M, Dawson, G e Sweeley C.C . Analysis of Trimethylsilyl Derivatives of Carbohydrates by Gas Chromatography and Mass Spectrometry *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1968) 1728-1740
- Dell'Agnola, G., Ferrari, G. "Effect of humic acids on anion uptake by excised barley roots". In: Proceedings of the International Symposium Humus et Planta V. Praga (1971) 567–570.
- Dell'Agnola, G., Ferrari, G., Nardi, S. Antidote action of humic substances on atrazine inhibition of sulphate uptake in barley roots. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 15 (1981) 101–104.
- E. Breitmaier, W. Voelter In: H.F. Ebel (Ed.), <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy, Monographs in Modern Chemistry, H.F. Ebel (Ed.) vol. 15, Verlag Chemie, Weinheim, 1978, p.247.
- Engelbreton, R., e von Wandruszka, R. Micro-organization of dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 1934-1941
- Fabbri, D., Helleur, R. Characterization of the tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis products of carbohydrates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 49 (1999) 277-293

- Fabbri, D., Chiavari, G., Galletti, G. C. Characterization of soil humin by pyrolysis-(TMAH/methylation)-gas chromatography/mass spectrometry: Structural relationships with humic acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 37 (1996) 161-172.
- Fan, T. W.-M., Higashi, R. M., Lane, A. N. Chemical characterization of a chelator-treated soil humate by solution-state multinuclear two-dimensional NMR with FTIR and pyrolysis-GCMS. *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 1636-1646.
- Flaig, W. "Uptake of organic substances from soil organic matter by plants" In: Study Week on Organic Matter and Soil Fertility, Wiley-Interscience, New York, (1968) 723-776.
- Flory, P.J., Fox, Jr, Y.G., 1951, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) :1904-1908
- Ghosh, K. e Schnitzer., M. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci.* 129 (1980) 266-276
- Gobé, V., Lemée, L., Amblès, A. Structure elucidation of soil macromolecular lipids by preparative pyrolysis and thermochemolysis. *Organic Geochemistry* 31 (200) 409-419.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I. Lignin dimers: Structures, distribution, and potential geochemical applications. *Geochim. Cosmochim. Acta* 49 (1992), 2097-2107
- González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Almendros, G., e Knicker, H. The effect of fire on soil organic matter-A review: *Environment International*, 30 (2004) 855-870
- González-Vila, F. J., Lankes, U., Lüdemann, H.-D. Comparison of the information gained by pyrolytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 58-59(2001) 349-359.
- Grasset, L. e Amblès, A. Structure of humin and humic acid from an acid soil as revealed by phase transfer catalyzed hydrolysis. *Organic Geochemistry* 29 (1998b) 881-891.
- Grasset, L., Amblès, A. Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique *J. Anal. Appl. Pyrol.* 47 (1998) 1-12
- Grasset. L., Amblès, A. Structure of humin and humic acids from acid soil as revealed by phase transfer catalyzed hydrolysis. *Org. Geochem.* 29 (1998b) 881-891

- Guignard, C., Lemée, L., Amblès, A. Lipid constituents of peat humic acids and humin. Distinction from directly extractable bitumen components using TMAH and TEAAc thermochemolysis. *Org. Geochem.* 36 (2005), 287-297
- Haider K, Martin J P e Filip Z “Humus biochemistry”. In: Soil Biochemistry. Eds. E A Paul e A D McLaren (Editori) . Mercel Dekker, 4 (1975) 195-244 New York.
- Haider,K. “The synthesis and degradation of humic substances in soil”. In: Trans. 13th Congr. Intern. Soc. Soil Sci. Hamburg, Germany, (1987) 644–656.
- Hansen E.H. e Schnitzer, M. Zinc-dust distillation and fusion of a soil humic acid. *Soil.Sci.Soc.Am.Proc.* 33 (1969b) 29-36
- Hansen E.H. e Schnitzer, M. Zinc-dust distillation of soil humic compounds. *Fuel* 48 (1969a) 41-46
- Hansen, E.H. e Schnitzer,M. The alkaline permanganate oxidation of Danish illuvial organic matter. *Soil Sci.Soc.Amer.Proc.* 30 (1966) 745-748
- Hatcher, P.G., e Spiker, E.C. “Selective degradation of plant biomolecules” In:., Humic substances and their role in the environment. Frimmel, F.H. e Christman, R.F.,(editori) Chichester, U.K., John Wiley & Sons, (1988) 59–74.
- Hatcher, P.G., Nanny, M.A., Minard, R.D., Dible, S.D., Carson, D.M. Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxydation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxyde (TMAH). *Org. Geochem.* 23 (1995) 881-888
- Hayes, M.H.B. e Swift R.S (1990), In: Soil Colloids and Their Associations in Aggregates, (DeBoodt M.F. e al., Editori), Plenum, New York, (1990) Cap. 10, p. 245
- Hayes, M.H.B. e Swift R.S. (1978), In: The Chemistry of Soil Constituents, (Greenland D.J. e HayesM.H.B., eEditori), Wiley, Chichester, (1978) Cap. 3, p.179
- Hayes, M.H.B., Clapp C.E. Humic substances: consideration of compositions, aspect of structure, and environmental influences. *Soil Sci* 166 (11) (2001) 723-737
- Hayes, MHB, MacCarthy P, Malcolm RL, Swift RS (editoris) (1989) Humic substances II. In search of structure. Wiley, New York, (1989) pp 4–31

- Hedges, J. I. "Polymerization of humic substances in natural environments". In: Humic Substances and Their Role in the Environment. F.H. Frimmel e R.F. Christman (editori). Wiley, Chichester, (1988) 45–58.
- Hedges, J.I. e Ertel, J.R. Characterization of lignin by capillary gas chromatography of cupric oxidation products. *Anal.Chem.* 57 (1982) 174-178
- Hertkorn, N., Permin, A., Perminova, I., Kovalevskii, D., Yudov, M., Petrosyan, V., Kettrup, A. Comparative analysis of partial structures of a peat humic and fulvic acid using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Environ. Qual.* 2002, 31(2002), 375-387.
- Hillitzer, A. Über den einfluss der humusstoffe auf das wurzelwachstum. *Beihefte zum Botanischen Zentralblatt* 49 (1932) 467–480.
- Holloway, P. J., 1982. "The chemical constitution of plant cutins". In: The Plant Cuticle (Edito da Cutler D. F., Alvin K. L. e Price C. E.), Linnean Society Symposium Series n° 10,45-85. Academic Press, (1982) London.
- Hunt, P.G. Microbiology of terrestrial crude oil degradation. *USA Nat. Techn. Inform. Serv. AD Rep.*, n° 742674, 17
- Hunt, S. M., Sheil, M. M., Derrick, D. J. *Eur. Mass Spectrom.* 4 (1998), 475-486
- Ibarra, J.V., Juan, R., Structural changes in humic acids during the coalification process. *Fuel* 64 (1985) 650-656.
- Ishiwatari, R., Hanninen, K., Letho, O., Tirronen, A., Tuhkanen, M., Malkonen, P. e Pohjala, E. Chemical degradation and oxidation studies of finnish peat and of peat humic fractions, qualitative analysis. In Proc.Int.Symposium on Peat Utilization, (Fuchsman C.H. e Spigarelli S.A, editori), Bemidji State University, Bemidji, (1983) pp 457-476
- Jambu, P., Amblès, A., Jacquesy, J.-C., Secouet, B., Parlanti, E.. Incorporation of natural alcohols from plant residues into an hydromorphic forest-podzol. *Journal of Soil Science* 44 (1993) 135-146.
- Jenkinson, D.S. "The fate of plant and animal residues in soil". In: The Chemistry of soil Processes (D.J. Greenland e M.H.B.Hayes, Editorieditori) pp.505-561. Wiley, Chichester.

- Jenkinson, D.S., e Ladd, J.N.,1981, "Microbial biomass in soil: Measurement and turnover". In: Soil Biochemistry: Paul, E.A. e Ladd, J.N.(editori) New York, Marcel Dekker, 5 (1981) 415–471.
- Kawamura, K., Ishiwatari R. Tightly bound  $\beta$ -hydroxy acids in a recent sediment. *Nature* 297 (1982)144-145
- Kelemen, S. R., Afeworki, M., Gorbaty,M.L., Kwiatek, P. J., Solum, M. S., Hu, J. Z., Pugmire, R. J. XPS and  $^{15}\text{N}$ NMRstudy of nitrogen forms in carbonaceous solids. *Energy Fuels* 16 (2002) 1507-1515.
- Kerssebaum, R., Godejohann, M., Hofmann, M. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* 89 (2002) 84-88.
- Kitson, F.G., Larsen, B.S. e McEwen C.N. Gas Chromatography and mass spectrometry: a pratical guide. Accademic Press. San Diego (1996)
- Kleinhempel, D., 1970, Albrecht Thear Archives, 14 (1970) 3-14
- Klok, J., Baas, M., Cox, H.C., de Leeuw, J.W., Rijpstra, W.I.C.e Schenck, P.A. The mode of occurrence of lipids in a Namibian shelf diatomaceous ooze with emphasis on the  $\beta$ -hydroxy fatty acids. *Org. Geochem.* 12 (1988) 75-80
- Knicker, H. Biogenic nitrogen in soils as revealed by solid-state carbon-13 and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Environ. Qual.* 29 (2000) 715-723.
- Knicker, H., del Rio, J. C., Hatcher, P. G., Minard, R. D. Identification of protein remnants in insoluble geopolymers using TMAH thermochemolysis/GC-MS. *Org. Geochem.* 32 (2001) 397-409.
- Knicker, H., Hatcher, P. G., Gonza'lez-Vila, F. J. Formation of heteroaromatic nitrogen after prolonged humification of vascular plant remains as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Environ. Qual.* 31 (2002) 444-449.
- Knicker, H., Lu'demann, H.-D.  $\text{N}^{-15}$  and  $\text{C}^{-13}$  CPMAS and solution NMR studies of  $\text{N}^{-15}$  enriched plant material during 600 days of microbial degradation. *Org. Geochem.* 23 (1995) 329-341.
- Kohl, S.D., Toscano, P.J., Hou, W., e Rice, J.A. Solide-state  $^{19}\text{F}$  NMR investigation of hexafluorobenzene sorption to soil organic matter. *Environ. Sci. technol.* 34 (2000) 204-210

- Kolattukudy P.E. Cuticle and suberin: extracellular matrix unique to plants. *J.Cell.Biochem.* 17A (1993) 12-17
- Kolattukudy, P. E., Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science* 208 (1980) 990-1000.
- Kolattukudy, P.E., Kronman, K., Poulouse, A.J. Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass-spectrometry. *Plant Physiol.* 55 (1975) 567-573
- Kramer, R. W., Kujawinski, E. B., Zang, X., Green-Church, K. B., Jones, R. B., Freitas, M. A., Hatcher, P. G. "Studies of the structure of humic substances by electrospray ionization coupled to a quadrupole-time of flight (Qq-TOF) mass spectrometer". In: Humic Substances: Structures, Models and Functions Ghabbour, E. A., Davies, G., (editori). Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, (2001) pp 95-107.
- Ladd, J.M., Butler, J.H.A. Inhibition and stimulation of proteolytic enzyme activities by soil humic acids. *Australian Journal of Soil Research* 7 (1971) 253–261
- Leenheer, J. A., Rostad, C. E., Gates, P. M., Furlong, E. T., Ferrer, I. Molecular resolution and fragmentation of fulvic acid by electrospray ionization/multistage tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 1461-1471.
- Lehtonen, T., Peuravuori, J., Pihlaja, K. Characterisation of lake-aquatic humic matter isolated with two different sorbing solid techniques: Tetramethylammonium hydroxide treatment and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 91-103.
- Lichtfouse, E. Plant wax n-alkanes trapped in soil humin by non covalent bonds. *Naturwissenschaften* 85 (1998) 449-452
- Lichtfouse, E., Berthier, G., Houot, S., Barriuso, E., Bergheaud, V., Vallaes, T. Stable carbon isotope evidence for the microbial origin of C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub> n-alkanoic acids in soils. *Org. Geochem.*, 23 (1995) 849-852
- Lopes, M.H., Armando, A.M.G., Silvestre, J.D., Pascoal Neto, . Composition of suberin extracts upon gradual alkaline methanolysis of *Quercus suber* L. cork. *J. Agric. Food Chem* 48 (2000) 383-391.

- Lu, X. Q., Hanna, J. V., Johnson, W. D. Source indicators of humic substances: An elemental composition, solid state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. *Appl. Geochem.* 15 (2000) 1019-1033.
- M. Regert, H.A. Bland, S.N. Dudd, P.F. van Bergen, R.P. Ever- 512 shed. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265 , (1998) 513-521.
- Mahieu, N., Olk, D. C., Randall, E. W. Accumulation of heterocyclic nitrogen in humified organic matter: A  $^{15}\text{N}$  NMR study of lowland rice soils. *Eur. J. Soil Sci.* 51 (2000) 379-389.
- Malcom, R.E., Vaughan, D. Effects of humic acid fractions on invertase activities in plant tissues. *Soil Biology & Biochemistry* 11 (1978) 65–72.
- Malcom, R.E., Vaughan, D. Humic substances and phosphatase activities in plant tissues. *Soil Biology & Biochemistry* 11 (1979) 253–259.
- Mao, J.-D., Xing, B., Schmidt-Rohr, K. New structural information on a humic acid from two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation solid-state nuclear magnetic resonance. *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1928-1934.
- Marseille, F., Disnar, J. R., Guillet, B., Noack, Y. n-Alkanes and free fatty acids in humus and A1 horizons of soils under beech, spruce and grass in the Massif-Central (Mont-Lozère), France. *European Journal of Soil Science* 50 (1999) 433-441.
- Martin-Neto, L., Traghetta, D. G., Vaz, C. M. P., Crestana, S., Sposito, G. On the interaction of mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances. *J. Environ. Qual.* 30 (2001) 520-525.
- Matzke, K. Rieder, M. A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L. *Planta* 185 (1991) 233-245
- McIntyre, C., Batts, B.D., Jardine, D.R. Electrospray mass spectrometry of groundwater organic acids. *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 328-330.
- McIntyre, C., Jardine, D., McRae, C. Electrospray mass spectrometry of aquatic fulvic acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1974-1975
- McKenna, E.J. e Kallio, R.E. “Hydrocarbon structure: its effect on bacterial utilisation of alkanes”. In: Principles and applications in aquatic microbiology. John Wiley e Figli Inc, New York, (1964) 1-14

- Mollova N. e Longevialle P. Electron ionization induced fragmentation of macrocyclic amines  $C_nH_{2n}NH_3$ : Evidence for the rearrangement of aminocarbene radical cations and comparison with long-chain esters. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1 (1990) 128-248
- Muscolo, A. e Nardi, S. Effetti di due frazioni umiche sul metabolismo azotato di cellule di *Daucus carota*. IV Convegno Nazionale dell' IHSS, Le ricerche di base e le applicazioni delle sostanze umiche alle soglie del 2000. Alghero, (1999) Italy, pp. 103–106.
- Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F., Nardi, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biology & Biochemistry* 31 (1999) 1303–1311.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., Nardi, S. IAA detection in humic substances. *Soil Biology & Biochemistry* 30 (1998) 1199–1201.
- Muscolo, A., Felici, M., Concheri, G., Nardi, S. Effect of earthworm humic substances on esterase and peroxidase activity during growth of leaf explants of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Biology and Fertility of Soils* 15 (1993) 127–131.
- Muscolo, A., Nardi, S. “Effetti di due frazioni umiche sul metabolismo azotato di cellule di *Daucus carota*”. In: IV Convegno Nazionale dell' IHSS Le ricerche di base e le applicazioni delle sostanze umiche alle soglie del 2000. (1999) Alghero, Italy, pp. 103–106.
- Myneni, S. C. B. “Soft X-ray spectroscopy and spectromicroscopy studies of organic molecules in the environment”. In: Applications of Synchrotron Radiation in Low Temperature Geochemistry and Environmental Science. Fenter, P. A., Rivers, M. L., Sturchio, N.C., Sutton, S. R., (editori). Mineralogical Society of America: Washington, DC, 2002 pp 485-579.
- Naafs, D.F.W. van Bergen, P.F. Effects of pH adjustments after base hydrolysis: implication for understanding organic matter in soils. *Geoderma* 106 (2002) 191-217
- Naafs, D.F.W., van Bergen, P.F., de Jong, M.A., Oonincx, A., de Leeuw, J.W. Total lipid extracts from characteristic soil horizons in a podzol profile. *Eur. J. Soil Sci.* 55 (2004) 657-669.



- Nardi, S., Concheri, G., Dell'Agnola, G., 1996. "Biological activity of humic substances". In: Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Piccolo, A., (ed.), Elsevier, Amsterdam, (1996) pp. 361–406.
- Nardi, S., Concheri, G., Dell'Agnola, G., Scrimin, P. Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. *Soil Biology & Biochemistry* 23 (1991) 833–836.
- Nardi, S., Panuccio, M.R., Abenavoli, M.R., Muscolo, A. Auxinlike effect of humic substances extracted from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biology & Biochemistry* 26 (1994) 1341–1346.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Gessa, C., Ferrarese, L., Trainotti, L., Casadoro, G. A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. *Soil Biology & Biochemistry* 32 (2000b) 415–419.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Dalla Vecchia, F., Concheri, G. Effects of forest humus on biological activity in roots of *Pinus sylvestris* related to chemical humus fraction characteristics. *Fresenius Environmental Bulletin* 7 (1998) 203–208.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vinello, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology & Biochemistry* 34 (2002) 1527–1536
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Reniero, F., Rascio, N., Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. *Soil Science Society of America Journal* 64 (2000a) 639–645.
- Nicolaus "Melanins" Hermann Paris (1968)
- Nierop, K. G. J., Pulleman, M. M., Marinissen, J. C. Y. Management induced organic matter differentiation in grassland and arable soil: A study using pyrolysis techniques. *Soil Biol.Biochem.* 33 (2001) 755-764.
- Nierop, K.G.J. Origin of aliphatic compounds in a forest soil. *Org. Geochem.* 29 (1998) 1009-1016
- Nierop, K.G.J., Naafs, D.F.W., Verstraten, J.M. Occurrence and distribution of ester-bound lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Org. Geochem.* 34 (2003) 719-729
- Novotny, F.J., Rice, J.A.. Characterization of fulvic acid by laser-desorption mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 29 (1995) 2464- 2466

- O'Donnell, R.W. The auxin-like effects of humic preparations from leonardite. *Soil Science* 116 (1973) 106–112.
- Oros D. R., Simoneit B. R. T. identification of molecular tracers in organic aerosols from temperate climate vegetation subjected to biomass burning. *Aerosol Science and Technology* 31 (1999) 433–445.
- Oros, D.R., Mazurek, M.A., Baham, J.E., e Simoneit, B.R.T., Organic tracers from wild fire residues in soils and rain/river wash-out. *Water, Air, and Soil Pollution*, 137 (2002) 203–233.
- Page, D. W., van Leeuwen, J. A., Spark, K. M., Mulcahy, D. E. Pyrolysis characterization of plant, humus and soil extracts from Australian catchments. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 65 (2002), 269-285.
- Petrovic, P., Vitorovic, D., e Jablanovic, M. Investigation of biological effects of humic acids. *Acta Biol, Med. Exp.* 7 (1982) 21-25
- Pfeifera, T., Klaus, U., Hoffmannb, R., Spiteller M., Characterisation of humic substances using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation mass spectrometry combined with size-exclusion chromatography *Journal of Chromatography A*, 926 (2001) 151–159
- Pflug, W., Ziechmann, W. Inhibition of malate dehydrogenase by humic acids. *Soil Biology & Biochemistry* 13 (1981) 293–299.
- Piccolo, A. Characteristics of soil humic substances extracted with some organic and inorganic solvents and purified by the HCl-HF treatment. *Soil Sci.* 146 (1988) 418-426
- Piccolo, A. Humus and soil conservation. In: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems* (ed. A. Piccolo), Elsevier, Amsterdam (1996) 225-264.
- Piccolo, A. S. Nardi, e G. Cancheri.. Macromolecular changes of soil humic substances induced by interactions with organic acids. *Eur. J. Soil Sci.* 47 (1996a) 319–328.
- Piccolo, A. The Supramolecular Structure of Humic Subsaatances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. *Adv. Agron.* 75 (2002) 57-134
- Piccolo, A., e P. Conte.. Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. *Adv. Environ. Res.* 3 (2000) 508–521.

- Piccolo, A., Conte, P., e Cozzolino, A. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *Eur. J. Soil Sci.* 50 (1999) 687–694.
- Piccolo, A., Conte, P., Spaccini, R., Chiarella, M. Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. *Biol. Fertil. Soils* 37 (2003) 255–259
- Piccolo, A., Conte, P., Trivellone E., Van Lagen B., P. Buurman P. Reduced heterogeneity of a lignite humic acid by preparative HPSEC following interaction with an organic acid. Characterization of size-separates by PYR-GC-MS and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *Environmental Science and Technology* 36 (2002) 76–84
- Piccolo, A., G. Celano, e P. Conte. Interactions of Glyphosate with humic substances. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996c) 2442–2446.
- Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G. Structural characteristics of humus and biological activity. *Soil Biology & Biochemistry* 24 (1992) 273–380.
- Piccolo, A., The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science* 166 (2001) 810–832
- Piccolo, A., Conte, P. In Structure and Surface Reactions of Soil Particles. Huang, P. M., Senesi, N., Buffle, J., (eEditori)s. Wiley: New York, (1998) pp 184–250.
- Piccolo, A., Spiteller, M. Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 1047.
- Piccolo, A. S. Nardi, e G. Cancheri.. Micelle like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. *Chemosphere* 33 (1996b) 595–600.
- Piccolo, A., Spaccini, R., Haberhauer, Gerzabek, M.H. Increased Sequestration of Organic Carbon in Soil by Hydrophobic Protection. *Naturwissenschaften* 86 (1999) 496–499
- Pinton, R., Cesco, S., Iacoletti, G., Astolfi, S., Varanini, Z. Modulation of nitrate uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. *Plant Soil* 215 (1999a) 155–163.
- Plancque, G., Amekraz, B., Moulin, V., Toulhoat, P., Moulin, C. Molecular structure of fulvic acids by electrospray with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spec.* 15 (2001) 827–835.

- R. A Kleinhempel, D. Albrecht Thaer Arch. 14, 3 (1970).
- Rashid, M.A. Geochemistry of Marine Humic Compounds. Springer-Verlag, New York (1985)
- Ray, A. K., Stark, R. E. Isolation and molecular structure of an oligomer produced enzymatically from the cuticle of lime fruit. *Phytochemistry* 48 (1998) 1313-1320.
- Reemtsma, T., These, A. On-line coupling of size Exclusion Chromatography with Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Aquatic Fulvic and Humic Acids. *Analytical Chemistry* 78 (2003) 1500-1507
- Riederer, M., Matzke, K., Ziegler, F., Kögel-Knabner, I. Occurrence, distribution and fate of the lipid plant biopolymers cutin and suberin in temperate forest soils. *Org. Geochem.* 20 (1993)1063-1076
- Rosswall, T, Kvillner, E Principal components and factor analysis for the description of microbial populations. *Adv Microb Ecol* 2 (1978) 1–48
- Ryser U., Holloway P. J. Ultrastructure and chemistry of soluble and polymeric lipids in cell walls from seed coats and fibres of *Gossypium* species. *Planta* 163 (1985) 151-163.
- Saiz-Jimenez, C. “The chemical structure of humic substances: Recent advances”. In: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Piccolo, A., (ed.) Elsevier: New York, (1996) pp 1-44.
- Saiz-Jimenez, C. Analytical pyrolysis of humic substances: pitfalls, limitations, and possible solutions. *Environmental Science and Technology* 28 (1994) 1773-1780.
- Saiz-Jimenez, C., de Leeuw, J. W. Chemical characterization of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Applied Pyrolysis* 9 (1986b) 99-119.
- Santos Bento, M.F., Pereira, H., Cunha, M.Á., Moutinho, A.M.C. van der Berg, K.J. Boon, J.J. A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L., using thermally assisted transmethylation GC-MS. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 2001, 57 (2001), 45-55
- Schmidt, M. W. I., Knicker, H., Hatcher, P. G., Kögel-Knabner, I. Improvement of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and

- organic material by treatment with 10% hydrofluoric acid. *Eur. J. Soil Sci.* 48 (1997) 319-328.
- Schmidt-Rohr, K., Mao, J.-D., Olk, D. C. Nitrogen-bonded aromatics in soil organic matter and their implications for a yield decline in intensive rice cropping. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 101 (2004) 6351-6354.
- Schnitzer, M. A “lifetime perspective on the chemistry of soil organic matter.” In: *Adv. Agron.*, Sparks, D. L., (eEd.). Academic Press: San Diego, CA, 68 (2000) Vol. 68, pp 1-58.
- Schnitzer, M. e Wright, J.R. Studies on the oxidation of the organic matter of the A0 and Bh horizons of podzol. *Trans. 7th Intern. Congr. Soil. Sci.*, (Madison), 2 (1960a) 112-119
- Schnitzer, M., e S.U.Khan. *Humic Substances in the Environment*. Marcel Dekker, (1972) New York.
- Schulten, H.-R. Analytical pyrolysis and computational chemistry of aquatic humic substances and dissolved organic matter. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 1999 , 49 (1999) 385-415.
- Schulten, H.-R., Leinweber, P., Schnitzer, M. Analytical pyrolysis and computer modelling of humic and soil particles. In: *Structure and Surface Reactions of Soil Particles*, Huang, P. M., Senesi, N., Buffle, J., (editori) John Wiley e Sons Ltd.: New York, (1998) 281-324.
- Schulten, H.-R., Schnitzer, M. The chemistry of soil organic nitrogen: A review. *Biol. Fertil. Soils* 1998, 26, (1998) 1-15.
- Shi, W., Sun, M.-Y, Molina, M., Hodson, R.E. Variability in the distribution of lipid biomarker and their molecular isotopic composition in Altamaha estuarine sediments: implication for the relative contribution of organic matter from various sources. *Org. Geochem.* 32 (2001) 331-336
- Sihombing, R., Greenwood, P.F., Wilson, M.A., Hanna, J.V. Composition of size exclusion fractions of swamp water humic and fulvic acids as measured by solid state NMR and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Org. Geochem.* 24 (1996) 859-873
- Simoneit, B.R.T. Biomass burning—a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. *Applied Geochemistry*, 17 (2002) 129–162.

- Simoneit, B.R.T., Rogge, W.F., Mazurak, M.A., Standley, L.J., Hildemann, L.M., Cass, G.R. Lignin pyrolysis products, lignans, and resin acids as specific tracers of plant classes in emissions from biomass combustion. *Environmental Science and Technology* 27 (1993) 2533–2541.
- Simpson, A. J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.*, 40 (2002) S72-S82.
- Simpson, A. J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 40 (2002) S72-S82.
- Simpson, A. J., Burdon, J., Graham, C. L., Hayes, M. H. B., Spencer, N., Kingery, W. L. Interpretation of heteronuclear and multidimensional NMR spectroscopy of humic substances. *Euro. J. Soil Sci.* 52 (2001) 495-509.
- Simpson, A.J., Kingery, W.L., Hayes, M.H.B., Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., Kerssebaum, R., Godejohann, M., e Hofmann, M. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften* 89 (2002) 84–88.
- Smernik, R. J., Baldock, J. A. Does solid-state <sup>15</sup>N NMR spectroscopy detect all soil organic nitrogen? *Biogeochemistry* (2005) in press.
- Spaccini, R., A. Piccolo, G. Haberhauer, M. Stemmer, e M. H. Gerzabek. Decomposition of maize straw in different European soils as revealed by DRIFT spectra of soil particle fractions. *Geoderma* 99 (2001) 245–260.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Haberhauer, G., Gerzabek, M. H. Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by <sup>13</sup>C distribution and CPMAS-NMR. *Eur.J. Soil Sci.* 51 (2000)583-594.
- Staude, F. e Patat, F., Cleavage of the C-O-C bond. In *The chemistry of the Ether linkage*, ed. S.Patai. Cap. 2, John Wiley, London.
- Stenson, A. C., Landing, W. M., Marshall, A. G., Cooper, W. T. Ionization and Fragmentation of Humic Substances in Electrospray Ionization Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry *Anal. Chem.* 74 (2002) 4397-4409

- Stevenson F.J. "Humic Substances II". In: Search of Structure. Hsyes M.H.B. e al., (editori), Wiley, Chichester, (1989) Cap. 2, p.121
- Stevenson F.J. e Cole M.A. The cycles of soils, 2° edn. Wiley, New York (1999)
- Stevenson, F.J. "Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions", Seconda ed., Wiley, New York, (1994) 496
- Stevenson, F.J. "Organic matter—micronutrient reactions in soil". In: Micronutrients in Agriculture, Mortvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M., Welch, R.M. (editori), Soil Science Society of America, Madison, (1991) pp. 145–186.
- Sutton, R e Sposito, G. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View *Environ. Sci. Technol* (2005)
- Tegelaar, E., de Leeuw, J.W., Holloway, P. Some mechanisms of flash pyrolysis of naturally occurring higher plant polyesters. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 15 (1989) 289–295.
- Tegelaar, E.W., Hollman, G., Van der Vegt, P., de Leeuw, J.W., Holloway, P.J. Chemical characterization of the periderm tissue of some angiosperm species: recognition of an insoluble, non-hydrolyzable, aliphatic biomacromolecules (Suberan). *Org. Geochem.* 23 (1995) 239-250
- Tegelaar, E.W., Wattendorff, J., de Leeuw, J.W. Possible effects of chemical heterogeneity in higher land plant cuticles on the preservation of its ultrastructure upon fossilization. *Rev. Palaeob. Palyn.*, 77 (1993) 149-170
- Vairavamurthy, A., Wang, S. Organic nitrogen in geomacromolecules: Insights on speciation and transformation with K-edge XANES spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3050-3056.
- van Bergen, P. F., Flannery, M. B., Poulton, P. R., Evershed, R. P. "Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments III. Nitrogen-containing macromolecular moieties in soil organic matter from Geescroft Wilderness". In: Nitrogen-containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere. Stankiewicz, B. A., van Bergen, P. F. (editori) ACS Symposium serie, 707. Oxford Univ. Press, New York, 707 (1998b) 321-338.
- van Bergen, P.F., Hatcher, P.G., Boon, J.J., Collinson, M.E., de Leeuw, J.W., 1997. Macromolecular composition of the propagule wall of *Nelumbo Nucifera*. *Phytochem.* 45 (1997), 601-610.

- van Bergen, P.F., Bull, I.D., Poulton, P.R., Evershed, R.P. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments – I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness. *Org. Geochem.* 26 (1997) 117-135
- van de Meent, D., Brown, S.C., Philip, R.P., Simoneit, B.R.T., 1980. Pyrolysis high resolution gas chromatography and pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry of kerogen precursors. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 44 (1980) 999–1014.
- Vane, C.H., Abbott, G.D., Head, I.M. The effect of fungal decay (*Agaricus bisporus*) on wheat straw lignin using pyrolysis-GC-MS in the presence of tetramethylammonium hydroxyde (TMAH). *J. Anal. App. Pyrol.* 60 (2001) 69-78
- Varanini, Z., Pinton, R., 1995. “Humic substances and plant nutrition”. In: *Progress in Botany*. Luttge, U., (Ed.) vol. 56. (1995) Springer, Berlin, pp. 97–117.
- Varanini, Z., Pinton, R., De Biasi, M.G., Astolfi, S., Maggioni, A. Low molecular weight humic substances stimulated H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa L.*) roots. *Plant and Soil* 153 (1993) 61–69.
- Varanini, Z., Pinton, R.. “Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition”. In: *The Rhizosphere*, Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (Editori) Marcel Dekker, (2001) Basel, pp.141–158.
- Vaughan, D. “Effetto delle sostanze umiche sui processi metabolici delle piante”. In: *Sostanze Umiche effetti sul terreno e sulle piante*. Burns, R.G., Dell’Agnola, G., Miele, S., Nardi, S., Savoini, G., Schnitzer, M., Sequi, P., Vaughan, D., Visser, S.A. (Editori) Ramo Editoriale degli Agricoltori, Roma, (1986) pp. 59–81.
- Vaughan, D. The stimulation of invertase development in aseptically stored tissue slices by humic acid. *Soil Biology & Biochemistry* 1 (1967b) 15–28.
- Vaughan, D., Malcom, R.E. “Influence of humic substances on growth and physiological processes”. In: *Soil Organic Matter and Biological Activity*, Vaughan, D., Malcom, R.E. (Editori) Martinus Nijhoff/Junk W, Dordrecht, The Netherlands, (1985) pp. 37–76.



- Vaughan, D., Malcom, R.E., Ord, B.G., 1985. "Influence of humic substances on biochemical processes in plants". In: Soil Organic Matter and Biological Activity. Vaughan, D., Malcom, R.E. (eEditori) Martinus Nijhoff/Junk W, Dordrecht, The Netherlands, (1985) pp. 77–108.
- Vaughan, D." Effect of humic acid on the development of invertase activity in slices of beetroot tissues washed under aseptic conditions". In: Humus et Planta IV, (1967a) 268–271.
- Vidavsky I., Chorush R.A., Longevialle P. e McLafferty F.W. Functionnal Group Migration in Ionized Long-Chain Compounds. *J.Am.Chem Soc.*, 116 (1994) 5865-5872
- Visser, S.A. "Effetto delle sostanze umiche sulla crescita delle piante". In: Sostanze Umiche. Effetti sul Terreno e sulle Piante. Burns, R.G., Dell'Agnola, G., Miele, S., Nardi, S., Savoini, G., Schnitzer, M., Sequi, P., Vaughan, D., Visser, S.A. (Editori), Ramo Editoriale degli Agricoltori, Roma, (1986) pp. 96–143.
- Visser, S.A. Effect of humic substances on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *The Science of the Total Environment* 62 (1987) 347–354.
- Wallis A.F.A. Solvolysis by acids and bases. In Lignins, (Sarkanen K.V. e Ludwig C.H., Editori) Wiley, New York e Chichester, (1971) pp.345-372 Washington, DC, 2002 pp 485-579.
- Wershaw, R. L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic chemicals in soil water and sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.* 1(1986) 29-45
- Wershaw, R. L. Model for humus in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993) 814-816
- Wershaw, R.L. e Pinckney, D.J. The fractionation of humic acids from natural water systems. *Journal of Research of the U.S. Geological Survey* 1 (1973) 361–366.
- Wershaw, R.L. Membrane-micelle model for humus in soils and sediments and its relation to humification. *U.S. Geological Survey Water-Supply Paper* 2410 (1994) 48-55
- Winkler, A., Haumaier, L., Zech W., Insoluble alkyl carbon components in soils derive mainly from cutin and suberin. *Organic Geochemistry* 36 (2005) 519-529

- Wright, J.R. e Schnitzer, M. Alkaline permanganate oxidation of the organic matter of the A<sub>0</sub> and B<sub>21</sub> horizons of a podzol. Can., *J. Soil. Sci.*, 39(1959b) 44-53
- Yu, Zhongtang, Stewart, G.R. Mohn, W.W. Apparent contradiction, Psychrotolerant bacteria from hydrocarbon-contaminated arctic tundra soils that degrade diterpenoids synthesized by trees: *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000) 5148–5154.
- Zang, X., Brown, J. C., van Heemst, J. D. H., Palumbo, A., Hatcher, P. G. Characterization of amino acids and proteinaceous materials using online tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis and gas chromatography-mass spectrometry technique. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 61 (2001) 181-193.
- Zang, X., van Heemst, J. D. H., Dria, K. J., Hatcher, P. G. Encapsulation of protein in humic acid from a histosol as an explanation for the occurrence of organic nitrogen in soil and sediment. *Org. Geochem.* 31 (2000) 679-695.

